



**Helena Isabel Soares
Dinis Coelho**

**Estudo da Resposta Fototáctica do Microfitobentos
Estuarino**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2006

**Helena Isabel Soares
Dinis Coelho**

**Estudo da Resposta Fototáctica do Microfitobentos
Estuarino**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências das Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Dr. João António de Almeida Serôdio, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutora **Filomena Maria Cardoso Pedrosa Ferreira Martins**, Professora Associada da Universidade de Aveiro

vogais

Doutora **Vanda Brotas Costa Gonçalves**, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutor **João António de Almeida Serôdio**, Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro (**Orientador**)

agradecimentos

Ao Professor João Serôdio, orientador científico, o meu sincero obrigada por toda a confiança, apoio, força e sentido de oportunidade na realização deste trabalho.

Às minhas colegas Sónia Vieira e Sónia Cruz agradeço a ajuda, o apoio, as dicas, as 'madrugadas' no campo e as horas no laboratório... essenciais para a realização deste trabalho.

Quero ainda agradecer aos meus amigos todo o apoio, amizade e compreensão, que souberam estar onde e quando foi preciso. E em especial, um grande obrigada aos quatro magníficos lá de casa (Bina, Bruno, Deni e Su) que me aturaram, em especial nestes últimos tempos, transmitindo força e vontade.

Por fim, agradeço todo o apoio e carinho dos meus pais e das minhas irmãs, sem os quais a realização desta tese teria sido provavelmente impossível.

A todos, muito obrigada!

palavras-chave

Microfitobentos, biomassa, irradiância, migração vertical, fluorometria de pulso modulado, reflectância, resposta fototáctica, curva de fotoacumulação

resumo

O microfitobentos (MPB) é um dos grupos de produtores primários estuarinos mais importantes, formando biofilmes dominados por comunidades de diatomáceas na superfície dos sedimentos intertidais. As comunidades microfitobênticas intertidais são reconhecidas pela característica conspícua de executarem movimentos migratórios verticais, que afectam a produtividade primária dos ecossistemas estuarinos. O presente estudo teve como objectivo a caracterização da resposta fototáctica do MPB, pela monitorização da variação de biomassa microfitobêntica na zona fótica em resposta às variações na irradiância incidente. O trabalho foi desenvolvido através da aplicação de duas técnicas não-invasivas: (a) fluorescência da clorofila (chl) *in vivo* (PAM – Fluorometria de pulso modulado), com medição de nível mínimo de fluorescência (F_0) e (b) Análise Espectral de Reflectância, com quantificação da biomassa pelo Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI). Estas metodologias foram aplicadas a sedimentos com diferentes granulometrias e diferente composição taxonómica a fim de caracterizar e comparar as respostas fototáticas de diferentes comunidades microfitobênticas. As medições foram realizadas em amostras intactas de sedimento, expostas simultaneamente a diferentes níveis de irradiância entre 0 e $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A resposta fototáctica foi caracterizada quantitativamente pela construção de curvas de fotoacumulação (curva biomassa vs. irradiância). Foram encontradas correlações altamente significativas entre F_0 e chl *a* ($r^2=0.932$, $P<0.001$) e entre NDVI e chl *a* ($r^2=0.837$, $P<0.001$) o que permitiu confirmar a viabilidade do uso das técnicas não-invasivas para estimar a biomassa do MPB. Os resultados revelaram uma resposta migratória bifásica, incluindo uma resposta positiva sob luz baixa (do escuro até $50\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), indicando migração ascendente em resposta à luz, e uma resposta negativa (fotofóbica), levando à diminuição expressiva da biomassa, sob irradiâncias acima de $100\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este padrão de resposta fototáctica foi observado para os diferentes biofilmes estudados. Todavia, foram encontradas diferenças expressivas entre os dois tipos de amostra, com os biofilmes de sedimentos mais arenosos a exibirem uma menor amplitude de resposta fototáctica. Os resultados, em geral, permitem concluir que a resposta migratória em função da mutabilidade das condições luminosas pode funcionar como um mecanismo de fotoregulação e fotoprotecção comportamental, em alternativa aos mecanismos fisiológicos, evitando danos no aparelho fotossintético e optimizando a fotossíntese.

keywords

Microphytobenthos, biomass, irradiance, vertical migration, PAM fluorescence, reflectance spectra, phototactic response, photo-accumulation curve

abstract

Microphytobenthos (MPB) is one of the most important group of estuarine primary producers, forming diatom-dominated biofilms on the surface of intertidal sediments. The intertidal MPB assemblages are known to undergo vertical migratory movements, largely affecting the primary productivity of estuarine tidal flats. This work aimed the characterization of the migratory phototactic response of natural MPB, by monitoring the variation in MPB biomass present in the photic zone, as a response to changes in incident irradiance, by applying two non-invasive techniques: (a) *in vivo* chlorophyll (chl) fluorescence (PAM - Pulse Amplitude Modulated fluorometry), by measuring minimum fluorescence level, F_0 , and (b) high-resolution reflectance spectral analysis, by estimating the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI). Measurements were carried out on undisturbed samples simultaneously exposed to different irradiance levels, and the phototactic response was characterized by constructing photo-accumulation curves (biomass vs. irradiance).


Highly significant correlation was found between F_0 and chl *a* ($r^2=0.932$, $P<0.001$) and between NDVI and chl *a* ($r^2=0.837$, $P<0.001$) enabling the non-invasive estimation the MPB biomass using both techniques. The results revealed a bi-phasic migratory light response, that included a positive response under low light and a negative response (photophobic) under high light levels. Typical photo-accumulation curves displayed an increase from darkness to 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, indicating light-induced upward migration and a pronounced decrease above 100 – 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light level, indicating high light-induced downward migration. The same general phototactic response pattern was observed in biofilms from two locations with different sediments type and taxonomic composition. Nevertheless, significant differences were found between the two types of samples, with biofilms from the sandiers site exhibiting smaller amplitude of the phototactic response. In general, it was concluded that MPB use vertical migration as a behavioural photo-protective mechanism, for controlling exposure to variability light conditions, thus avoiding photo-physiological mechanism and photo-inhibition by moving to a depth where light conditions is optimal.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Índice de Figuras | 13 |
| Índice de Tabelas | 16 |
| Abreviaturas | 17 |
| | |
| 1. Introdução | 19 |
| 1.1. As zonas intertidais e o microfitobentos | 20 |
| 1.2. Comportamento migratório | 22 |
| 1.3. A Luz e o microfitobentos | 25 |
| 1.4. Metodologias para quantificação da biomassa produtiva | 25 |
| 1.4.1. Fluorometria de pulso modulado | 26 |
| 1.4.2. Análise espectral de reflectância | 27 |
| 1.5. Objectivos | 28 |
| | |
| 2. Material e Métodos | 31 |
| 2.1. Amostragem | 32 |
| 2.1.1. Enquadramento geográfico | 32 |
| 2.1.2. Colheita e processamento de amostras | 34 |
| 2.2. Fluorometria de pulso modulado | 35 |
| 2.3. Análise espectral de reflectância | 38 |
| 2.4. F_o e NDVI vs. biomassa superficial | 40 |
| 2.4.1. Quantificação da chl <i>a</i> | 40 |
| 2.5. Resposta fototáctica: curvas de fotoacumulação | 41 |
| 2.6. Composição taxonómica | 43 |
| 2.7. Análise estatística | 44 |
| | |
| 3. Resultados | 45 |
| 3.1. F_o e NDVI vs. biomassa superficial | 46 |
| 3.1.1. Efeito da pré-iluminação na relação F_o vs. chl <i>a</i> | 46 |
| 3.2. Resposta fototáctica: fluorescência (F_o) | 47 |
| 3.2.1. Curvas de fotoacumulação (biomassa vs. irradiância) | 50 |
| 3.3. Resposta fototáctica: reflectância espectral (NDVI) | 56 |
| 3.4. Aplicação das curvas de fotoacumulação na comparação de biofilmes (VA vs. GE) | 58 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1. Resposta fototáctica de biofilmes de GE | 58 |
| 3.4.2. Curvas de fotoacumulação de biofilmes de GE | 59 |
| 3.4.3. Comparação de biofilmes (VA vs.GE) | 60 |
| 4. Discussão | 65 |
| 4.1. Monitorização da biomassa do MPB através de métodos ópticos (F_o , NDVI) | 66 |
| 4.2. Resposta fototáctica e fotoprotecção comportamental | 69 |
| 4.2.1. Aplicação das curvas de fotoacumulação a diferentes biofilmes | 72 |
| 4.3. Implicações na modelação da produtividade primária | 73 |
| 5. Conclusões | 77 |
| 6. Referências Bibliográficas | 81 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Aspecto de biofilme microfitobêntico à superfície de sedimento estuarino na Ria de Aveiro, Portugal. | 20 |
| Figura 1.2. Representação esquemática dos movimentos verticais rítmicos à superfície do sedimento executados pelo MPB (PM – Preia-mar; BM – Baixa-mar; MPB – Microfitobentos;  - Movimento do MPB). | 23 |
| Figura 1.3. Variação da concentração de microalgas à superfície do sedimento consoante o período de emersão ou imersão/emersão nocturna registado por microscopia electrónica de varrimento (adaptado de CREMA L'Houmeau - <i>Benthic Productivity and Food Webs Team</i>) | 23 |
| Figura 1.4. Variação endógena da biomassa produtiva (F_o) em condições constantes, com manutenção do ritmo migratório ao longo de 3 dias (adaptado de Serôdio <i>et al.</i> 2005). | 24 |
| Figura 2.1. Localização e mapa da Ria de Aveiro (Aveiro, Portugal) com indicação das estações de amostragem (A) GE e (B) VA. | 32 |
| Figura 2.2. Estações de amostragem na Ria de Aveiro: (A) GE, no Canal de Mira e (B) VA, num braço do Canal de Ílhavo. | 33 |
| Figura 2.3. Aspecto do procedimento de colheita de amostras de sedimento na Ria de Aveiro. | 34 |
| Figura 2.4. Aspecto do procedimento laboratorial efectuado para o seccionamento das amostras de sedimento. | 35 |
| Figura 2.5. Aspecto do protótipo de fluorómetro modulado do tipo PAM. (A) unidade de controlo, (B) unidade de emissão-deteção WATER-EDF-Universal, (C) feixe de fibras ópticas com 6 mm de diâmetro. | 36 |
| Figura 2.6. Áreas de medição num anel de sedimento amostrado. | 37 |
| Figura 2.7. Sistema de medição de Reflectância. (A) espectroradiómetro USB2000-VIS-NIR, (B) amostra de sedimento e fibra óptica, (C) aspecto global do sistema de medição: espectroradiómetro acoplado ao computador. | 38 |
| Figura 2.8. Representação esquemática do protocolo experimental. | 42 |
| Figura 2.9. Aspecto do sistema de iluminação utilizado no protocolo experimental. | 43 |
| Figura 2.10. Câmara de Sedgewick-Rafter usada para a contagem de células. | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.1. Regressão linear entre a biomassa superficial ($\mu\text{g chl } a/\text{g}$ sedimento seco) e (A) a fluorescência da chl <i>a</i> após adaptação ao escuro (F_o , unidades relativas; $r^2=0.932$, $p<0.001$, $n=15$) e (B) NDVI ($r^2=0.881$, $p<0.001$, $n=13$). | 46 |
| Figura 3.2. Efeito da pré-iluminação na relação entre a fluorescência da chl <i>a</i> após adaptação ao escuro (F_o) e a biomassa (concentração de chl <i>a</i> $\mu\text{g/L}$), em suspensões de microalgas. Os números representam os diferentes níveis de irradiância aos quais as amostras foram expostas antes das medições ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para cada nível foi efectuada uma regressão linear cuja equação está representada no gráfico. | 47 |
| Figura 3.3. Resposta migratória fototáctica típica de MPB, com variação de F_o , para diferentes níveis de irradiância, em amostras intactas de sedimento de VA, durante um período coincidente com baixa-mar. As amostras foram pré-expostas a uma irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os números representam a irradiância prévia a cada medição de F_o ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). F_o foi normalizado aos valores iniciais, medidos imediatamente antes da separação das amostras pelos diferentes níveis de irradiância (tempo = 0). | 48 |
| Figura 3.4. Variação típica de F_v/F_m , para diferentes níveis de irradiância, em amostras de sedimento de VA. A barra preta horizontal indica o pré-período de tratamento em que a totalidade das amostras estiveram sujeitas ao mesmo nível de irradiância ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e os números representam a irradiância prévia a cada medição de F_v/F_m ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As amostras correspondem às da Figura 3.3. | 49 |
| Figura 3.5. Curva típica de fotoacumulação de VA. Relação entre a biomassa superficial (F_o) e a irradiância incidente, construída com base na Figura 3.3. Exemplo de curva adquirida aproximadamente 90 minutos após a exposição a diferentes níveis de luz. As barras verticais representam 1 desvio-padrão. | 50 |
| Figura 3.6. Fotografias da superfície do sedimento ao microscópio óptico, no decorrer do estudo da resposta fototáctica do MPB. A, B e C foram tiradas com objectiva de 10x e D, E e F de 4x. A e D representam amostras sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, B e E de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e C e F de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. | 52 |
| Figura 3.7. Curva de fotoacumulação de VA com inflexão final. Curva adquirida em condição semelhante às verificadas na legenda da Figura 3.5. As barras verticais representam 1 desvio-padrão. | 53 |
| Figura 3.8. Curva F_v/F_m em função da irradiância em amostras de VA. Exemplo de curva construída com base na Figura 3.3. As barras verticais representam 1 desvio-padrão. | 53 |
| Figura 3.9. Concentração de microalgas (A) e abundância relativa dos diferentes taxa de diatomáceas (B) no primeiro milímetro de sedimento de amostras de VA, após exposição a diferentes irradiâncias. Amostras correspondentes à Figura 3.5. Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 erro-padrão. Apenas estão representados os taxa com abundância relativa > 5%. | 56 |
| Figura 3.10. Exemplo de série temporal de espectros de reflectância adquiridos a cada 20 minutos à superfície de uma amostra de sedimento, após o início da baixa-mar. Amostra exposta a irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. | 57 |
| Figura 3.11. Comparação de curvas de fotoacumulação construídas a partir de F_o e NDVI, em amostras de VA. Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 desvio-padrão. | 58 |

- Figura 3.12.** Resposta migratória fototáctica típica de MPB, com variação de F_o , para diferentes níveis de irradiância, em amostras intactas de sedimento de GE. As amostras foram pré-expostas a uma irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os números representam a irradiância prévia a cada medição de F_o ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). F_o foi normalizado aos valores iniciais, medidos imediatamente antes da separação das amostras pelos diferentes níveis de irradiância (tempo = 0). 59
- Figura 3.13.** Curva típica de fotoacumulação de GE. Relação entre a biomassa superficial (F_o) com a irradiância incidente, construída com base na Figura 3.12. Exemplo de curva adquirida aproximadamente 90 minutos após a exposição a diferentes níveis de luz. As barras verticais representam 1 desvio-padrão. 60
- Figura 3.14.** Comparação de curvas de fotoacumulação que relacionam a biomassa com o nível de irradiância em biofilmes provenientes de sedimentos com diferentes granulometrias (VA: vasa; GE: areia vasosa). Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 desvio-padrão. 61
- Figura 3.15.** Concentração de microalgas (A e B) e abundância relativa dos diferentes taxa de diatomáceas (C e D) no primeiro milímetro de sedimento de amostras das duas estações de colheita (VA: vasa e GE: areia vasosa), após exposição a diferentes irradiâncias. Amostras correspondentes à Figura 3.14. Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 erro-padrão. Apenas estão representados os taxa com abundância relativa > 5%. 63

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1. Técnicas utilizadas na monitorização da migração vertical da biomassa produtiva (adaptado de Consalvey <i>et al.</i> 2004a). | 26 |
| Tabela 2.1. Parâmetros de fluorescência usados no presente estudo. | 38 |
| Tabela 3.1. Abundância relativa dos diferentes grupos presentes nas amostras observadas de VA. | 54 |
| Tabela 3.2. Abundância relativa (%) de todos os taxa identificados em VA. | 55 |
| Tabela 3.3 Abundância relativa (%) de todos os taxa identificados em GE. | 62 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| BG | - Índice azul-verde |
| c.d.o | - Comprimento de onda |
| chl <i>a</i> | - Clorofila <i>a</i> |
| chl <i>c</i> | - Clorofila <i>c</i> |
| D _n | - Sinal electrónico medido no escuro |
| EPS | - Polímeros extracelulares |
| F _o | - Fluorescência mínima após adaptação ao escuro |
| F _m | - Fluorescência máxima após adaptação ao escuro |
| F _v | - Fluorescência variável |
| F _v /F _m | - Rendimento quântico máximo do fotossistema II |
| IR-B | - Índice Infravermelho-Azul |
| Lu _s | - Radiação espectral emitida pela superfície do sedimento |
| Lu _d | - Reflectância de uma placa de referência (branco) |
| MPB | - Microfitobentos |
| NDVI | - Índice de Vegetação por Diferença Normalizada |
| PS II | - Fotossistema II |
| R-IR | - Índice Log R-IR |

1. INTRODUÇÃO

1.1. As zonas intertidais e o microfitobentos

As zonas intertidais dos estuários e ecossistemas costeiros são reconhecidas pela sua importância ecológica no que respeita à produtividade primária, encontrando-se entre os ecossistemas mais produtivos do planeta (Underwood e Kromkamp 1999, Dyer *et al.* 2000). Têm sido referidas pela importância em vários processos com elevado significado ecológico na transição entre os ambientes terrestres e marinhos, constituindo zonas de elevada riqueza natural. São áreas caracterizadas por uma forte dinâmica que no entanto tem vindo a ser condicionada pelas alterações globais (De Jonge e De Jong 2002). Actualmente quase 50% da população mundial vive nas zonas costeiras, aumentando a pressão antropogénica nestas áreas (CE-DGA 2001, Morris, 2005).

Durante os períodos diurnos de baixa-mar é comum observar densos aglomerados de microalgas (Figura 1.1) formando extensos biofilmes à superfície dos sedimentos estuarinos intertidais. Microfitobentos (MPB) é o termo atribuído ao conjunto de organismos fotossintéticos adaptados à sobrevivência nos sedimentos intertidais (Consalvey *et al.* 2004b).



Figura 1.1. Aspecto de biofilme microfitobêntico à superfície de sedimento estuarino na Ria de Aveiro, Portugal.

Os biofilmes são constituídos por organismos de vários grupos taxonómicos, dominados essencialmente por diatomáceas (Bacillariophyceae), embora possam ocorrer algas verdes (Chlorophyceae), euglenófitas (Euglenophyceae) e cianobactérias (Cyanobacteria) (Pinckney *et al.* 1994, MacIntyre *et al.* 1996). As comunidades microfitobênticas, no geral, colonizam diversos habitats, tais como sedimentos arenosos costeiros, sedimentos de lagoas interiores de águas paradas, sapais e zonas de sedimentos intertidais arenosos e vasosos (MacIntyre *et al.* 1996). As diatomáceas bênticas, referidas frequentemente como o grupo dominante, surgem essencialmente nos sedimentos intertidais vasosos e arenosos (Admiraal 1984, Brotas e Plante-Cuny 1998). Podem ser classificadas como epipsâmicas, formas aderentes que podem apresentar movimentos lentos entre os grãos de sedimento, ou epipélicas, com vida livre e capacidade de migração vertical (típicas dos sedimentos vasosos) (Round 1971, Admiraal 1984, Consalvey *et al.* 2004b).

Dada a significativa extensão dos biofilmes, estas comunidades são frequentemente os produtores primários mais importantes nos estuários (Underwood e Kromkamp 1999). Alguns estudos estimam que o MPB pode ser responsável por até 50% da produção primária total dos ecossistemas estuarinos (Underwood e Kromkamp 1999), apesar de limitado aos períodos de exposição à luz (Serôdio e Catarino 1999) e a variações significativas de temperatura (Blanchard *et al.* 1996). Todavia, vários autores têm demonstrado que a importância e influência do MPB não se restringe à produção primária nos ecossistemas costeiros e estuarinos (Guarini *et al.* 1998, Underwood e Kromkamp 1999, Blanchard *et al.* 2000, De Brouwer *et al.* 2003). O MPB contribui activamente para a modificação das propriedades do sedimento através da exsudação de polímeros extracelulares (EPS) (Underwood *et al.* 1995, Stal *et al.* 2003), reflectindo-se na estabilização dos sedimentos intertidais pelo aumento da resistência à erosão causada pela acção física das ondas e/ou tempestades (Paterson 1989, Yallop *et al.* 1994, Miller *et al.* 1996, De Brouwer *et al.* 2000, Consalvey *et al.* 2004b). Os EPS são compostos em 95% por polissacarídeos, que podem ser constituídos por açúcares neutros, ácido úrico e/ou açúcares sulfatados (Stal *et al.* 2003). Por outro lado, a forte actividade fotossintética do MPB influencia significativamente os fluxos de nutrientes e de oxigénio na interface sedimento-água (Bartoli *et al.* 2003, Tyler *et al.* 2003); considerando também que o MPB é, por si só, uma importante fonte alimentar para as comunidades pelágicas e de herbívoros (Miller *et al.* 1996, Underwood e Kromkamp 1999) torna-se essencial, para o entendimento das cadeias tróficas estuarinas, o conhecimento destes biofilmes (Middelburg *et al.* 2000).

1.2. Comportamento migratório

A migração é descrita como o movimento de um organismo de uma área para outra, conduzido com um propósito (Consalvey *et al.* 2004b). No ambiente marinho a migração vertical dos organismos na coluna de água é um fenómeno universal (Kingston 1999), todavia não é um fenómeno restrito à coluna de água e ocorre igualmente ao nível dos sedimentos marinhos e estuarinos, embora em menor escala (Palmer 1976, Kingston 1999).

A ocorrência de movimentos migratórios verticais rítmicos de microalgas, nomeadamente diatomáceas, formando à superfície dos sedimentos intertidais coloridos aglomerados durante o período de baixa-mar é uma característica conspícua, mas comum, da ecologia do MPB das zonas intertidais (Round e Palmer 1966, Serôdio *et al.* 1997, Kingston 1999). A mobilidade das microalgas no meio estuarino representa uma vantagem face às condições de instabilidade e adversidade destes ambientes (Kingston 1999, Consalvey *et al.* 2004b). Durante os períodos de emersão, as diatomáceas bênticas estão sujeitas a processos de dessiccação e danos por excesso de luz, causados por evaporação e intensidades luminosas elevadas. A necessidade de responder rapidamente às alterações do meio conduz as diatomáceas móveis a executar uma estratégia migratória que é apontada como uma razão de sucesso destes organismos no ambiente sedimentar (Consalvey *et al.* 2004b), e que, por exemplo, limita a exposição à energia luminosa excessiva num mecanismo de fotoprotecção/fotoregulação (Kromkamp *et al.* 1998, Underwood e Kromkamp 1999, Perkins *et al.* 2001, Serôdio *et al.* 2005).

As primeiras referências ao comportamento migratório do MPB remontam a 1907 (Fauvel e Bohn 1907), e têm progredido até à actualidade paralelamente ao avanço da tecnologia (Consalvey *et al.* 2004a). As migrações consistem em deslocações em direcção à superfície do sedimento no início dos períodos de baixa-mar diurnos e no sentido inverso com a aproximação da enchente em preia-mar ou da noite (Figura 1.2) (Round e Palmer 1966, Serôdio *et al.* 1997).

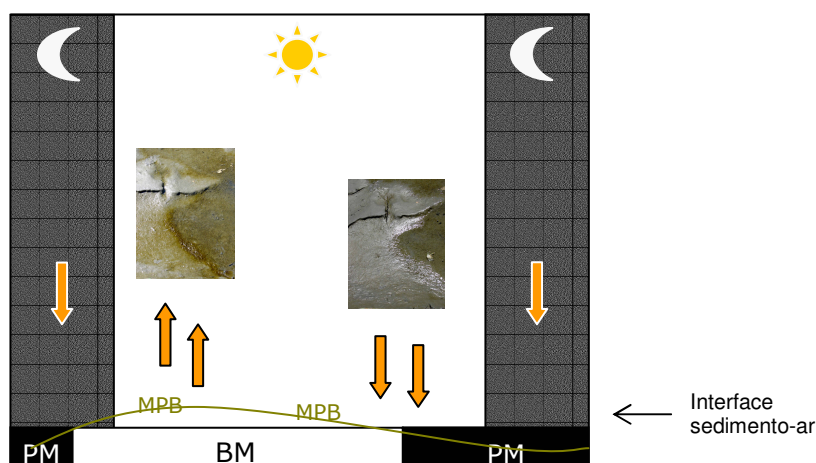


Figura 1.2. Representação esquemática dos movimentos verticais rítmicos à superfície do sedimento executados pelo MPB (PM – Preia-mar; BM – Baixa-mar; MPB – Microfitobentos; — - Movimento do MPB).

Os movimentos migratórios podem provocar mudanças drásticas nos padrões espaciais dos biofilmes à superfície do sedimento, resultando em variações rápidas e significativas na concentração de microalgas na camada superficial, sujeita a iluminação (zona fótica). As variações são facilmente detectáveis a olho nu, por observação directa das alterações de cor à superfície dos sedimentos intertidais, ou claramente evidenciadas por observação da superfície sedimentar em microscopia electrónica de varrimento (Figura 1.3).

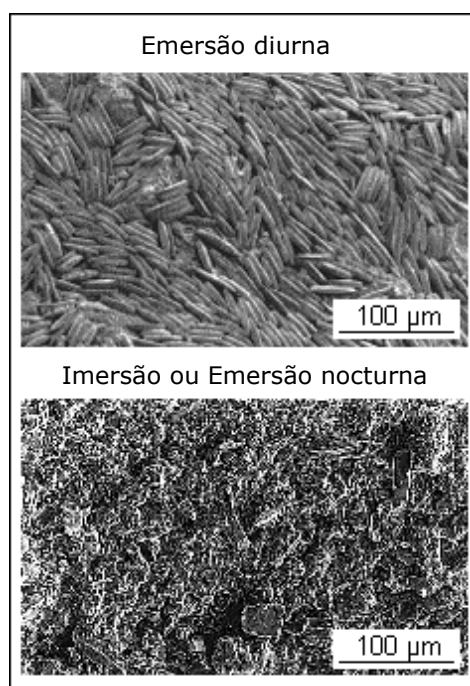


Figura 1.3. Variação da concentração de microalgas à superfície do sedimento consoante o período de emersão ou imersão/emersão noturna registado por microscopia electrónica de varrimento (adaptado de CREMA L'Houmeau - Benthic Productivity and Food Webs Team).

O comportamento migratório vertical é, pelo menos parcialmente, endógeno. Palmer e Round (1967), Serôdio *et al.* (1997) e mais recentemente Morris (2005), demonstraram experimentalmente a manutenção activa do ritmo migratório sincronizado (Figura 1.4), ao longo de vários dias, na ausência dos ciclos de maré e dia/noite. Os movimentos decorrem de informação memorizada nas células, sugerindo a existência de um mecanismo endógeno, que envolve um ou vários relógios biológicos (Morris 2005). Segundo Palmer e Round (1967) o ritmo endógeno verifica-se na manutenção dos movimentos verticais por mais de 11 dias após o isolamento das diatomáceas dos estímulos externos (maré e sol).

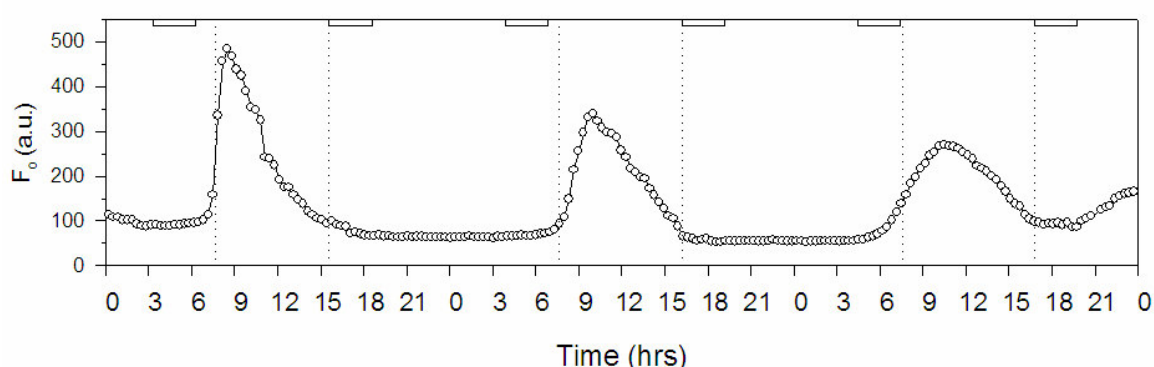


Figura 1.4. Variação endógena da biomassa produtiva (F_0) em condições constantes, com manutenção do ritmo migratório ao longo de 3 dias (adaptado de Serôdio *et al.* 2005).

A ocorrência de migrações nos milímetros superficiais do sedimento tem complicado a definição de biomassa microfitobêntica. A biomassa com capacidade fotossintética restringe-se à zona fótica. Em sedimentos coesivos é limitada aos primeiros 500 μm (Kromkamp *et al.* 1998) e nos sedimentos não coesivos pode estender-se a poucos cm (Paterson e Hagerthey 2001).

A alteração da concentração de microalgas causa variações muito significativas na biomassa produtiva (Serôdio *et al.* 2001) ou biomassa fotossinteticamente activa (PAB) (Honeywill *et al.* 2002), reflectindo-se nas taxas estimadas de produção primária. Deste modo assume grande importância o estudo e a caracterização deste comportamento, para a estimação e modelação da biomassa produtiva, incluindo a elevada variabilidade que ocorre durante os períodos de emersão em consequência dos fenómenos de migração vertical (Pinckney e Zingmark 1991, Guarini *et al.* 1999, Serôdio e Catarino 2000, Serôdio 2003). Esta necessidade requer um conhecimento detalhado das respostas migratórias das comunidades de microfitobentos num amplo conjunto de habitats e condições (Morris 2005).

1.3. Luz e microfitobentos

Os habitats ocupados pelo MPB são caracterizados pela existência de gradientes espaciais e temporais associados à disponibilidade de luz (Underwood e Kromkamp 1999). Tal como outros organismos sensíveis à luz, as diatomáceas móveis tem a capacidade de usar a informação sobre a disponibilidade de luz no ambiente para regular o seu comportamento e os movimentos, de forma a maximizar o acesso à energia luminosa, evitando predação e/ou danos no aparelho fotossintético (Cohn *et al.* 2004). Round *et al.* (1990) e Cohn (2001) mostraram a capacidade das diatomáceas para se acumularem em áreas luminosas e para executarem migrações verticais em resposta à luz. A necessidade de luz para a manutenção da migração vertical é suportada por observações de que o MPB não migra para a superfície durante a noite, mesmo que em maré baixa, ou durante o dia em condições de imersão (Palmer e Round 1967, Kingston 1999).

1.4. Metodologias para quantificação da biomassa produtiva

Tradicionalmente, a quantificação e monitorização da produtividade primária e da biomassa do microfitobentos envolve técnicas destrutivas e intrusivas (Consalvey *et al.* 2004b, Consalvey *et al.* 2005). São exemplo os estudos com “*lens tissue*” (Eaton e Moss 1966), a crio-fixação a baixa temperatura com aplicação em microscópio electrónico de varrimento (Paterson *et al.* 1986, Janssen *et al.* 1999), a extracção e subsequente quantificação da clorofila *a* (chl *a*) presente no sedimento por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) ou métodos espectrofotométricos (Pinckney *et al.* 1994, Honeywill *et al.* 2002). Recentemente têm sido desenvolvidos métodos não-destrutivos, que não condicionam a repetição de medições na mesma área ou amostra. A análise espectral de reflectância e a fluorescência têm sido frequentemente utilizados para monitorizar as variações relativas da biomassa fotossinteticamente activa (*e.g.* Serôdio *et al.* 1997, Kromkamp *et al.* 1998, Paterson *et al.* 1998, Honeywill *et al.* 2002, Consalvey *et al.* 2005, Morris 2005). Por outro lado, o uso destas técnicas remotas pretende ultrapassar os problemas impostos pela existência de vastas áreas colonizadas por MPB nas zonas intertidais, de acesso difícil e mesmo perigoso, facilitando uma monitorização rápida e exacta (Jesus *et al.* 2005 *in press*). A Tabela 1.1 reúne um conjunto de técnicas e

trabalhos associados à monitorização das variações de biomassa nas camadas superficiais de sedimento.

Tabela 1.1. Técnicas utilizadas na monitorização da migração vertical da biomassa produtiva (adaptado de Consalvey *et al.* 2004a).

| Migração monitorizada por: | Exemplos na literatura | Observações: |
|---------------------------------------|---|--|
| Olho nu | Perkins (1960) Paterson <i>et al.</i> (1998) | Variações de coloração à superfície do sedimento; Associação de diferentes cores a diferentes grupos de espécies. |
| "Lens Tissue" | Eaton e Moss (1966) | Camadas sequenciais de "lens tissue" sobre a superfície do sedimento, durante períodos em que ocorre migração das células para a superfície. |
| Microscópio Electrónico de Varrimento | Paterson (1986) Paterson <i>et al.</i> (1998) Consalvey <i>et al.</i> (2002) | Congelamento rápido das camadas superficiais do sedimento (flash frozen) <i>in situ</i> e observação de variações horizontais e verticais na distribuição de células/espécies sobre baixa temperatura numa data posterior. |
| Câmara de vídeo | Sündback <i>et al.</i> (1997) | Monitorização das células através de um microscópio (acoplado a um sistema de vídeo) sobre a superfície do sedimento. |
| Pigmentos | Paterson <i>et al.</i> (1998) De Brouwer e Stal (2001) Consalvey <i>et al.</i> (2002) | Pigmentos utilizados como indicadores de biomassa; alterações nos pigmentos correlacionadas com variações na biomassa. |
| Detecção Remota | Kromkamp <i>et al.</i> (1998) Paterson <i>et al.</i> (1998) | Variações na luz reflectida pela superfície do sedimento interpretadas como variações na concentração/composição dos pigmentos, que por sua vez são considerados indicadores de variações na biomassa. |
| Fluorimetria de Pulso Modulado (PAM) | Seródio <i>et al.</i> (1997) Kromkamp <i>et al.</i> (1998) Honeywill <i>et al.</i> (2002) Consalvey <i>et al.</i> (2002) | Parâmetros de fluorescência usados como indicadores de biomassa e variações nos parâmetros correlacionadas com variações da biomassa. |

1.4.1. Fluorimetria de pulso modulado (PAM)

As técnicas baseadas na fluorescência da chl *a* têm sido cada vez mais aplicadas em estudos *in* e *ex situ* da ecologia e fotofisiologia do MPB (Consalvey *et al.* 2005). São utilizadas na monitorização de variações de biomassa na superfície do sedimento (Seródio *et al.* 1997, Honeywill *et al.* 2002) ou de forma a obter informações sobre processos fotofisiológicos que ocorrem nos biofilmes (Kromkamp *et al.* 1998, Barraguet e Kromkamp 2000, Perkins *et al.* 2002).

A fluorimetria PAM é uma das técnicas desenvolvidas com maior sucesso. Foi desenvolvida originalmente para o estudo da fotossíntese das plantas superiores por Schreiber *et al.* (1986). Mais recentemente, foi aplicada ao estudo do MPB, principalmente pela possibilidade de obter medições não destrutivas e rápidas, nos biofilmes (Serôdio *et al.* 2001) e pela natureza portátil de muitos fluorômetros, o que contribui para o aumento da viabilidade dos estudos *in situ* (Consalvey *et al.* 2005). A base de aplicação da fluorescência do tipo PAM ao MPB assenta no pressuposto de que um incremento na chl *a* superficial do sedimento resultará num incremento proporcional na intensidade do sinal de fluorescência (Serôdio *et al.* 1997, Honeywill *et al.* 2002, Consalvey *et al.* 2005). Vários autores descreveram uma relação linear entre mínimo de fluorescência (F_0 , que representa o rendimento da fluorescência na ausência de processos fotoquímicos ou não-fotoquímicos) e a biomassa microfitobêntica em estudos laboratoriais e *in situ* (Schreiber *et al.* 1986, Serôdio *et al.* 1997, Barranguet e Kromkamp 2000, Serôdio *et al.* 2001, Honeywill *et al.* 2002). Contudo, as medições de fluorescência podem ser condicionadas pela variabilidade introduzida pelos movimentos migratórios verticais do MPB. Estes movimentos são desencadeados de forma a regular a exposição à luz e podem interferir na estima de diversos parâmetros fotofisiológicos (Perkins *et al.* 2002). Por outro lado, a fluorescência mínima (F_0) que é frequentemente utilizada como referência da biomassa produtiva microfitobêntica, pode também ser condicionada por vários factores, por exemplo: (a) período de adaptação ao escuro de modo a reverter o efeito de exposição à luz, (b) temperatura e (c) composição taxonómica (Consalvey *et al.* 2004a).

1.4.2. Análise espectral de reflectância

A análise espectral de reflectância é uma técnica não destrutiva utilizada especialmente em detecção remota. Sensores remotos usam as propriedades ópticas do sedimento para inferir sobre a distribuição e abundância dos organismos bênticos autotróficos (Consalvey *et al.* 2004a), com base no princípio de que o espectro reflectido traduz a cor do sedimento, e que está condicionado pelo grupo de microalgas dominante nos biofilmes respectivos (Paterson *et al.* 1998, Morris 2005). Esta técnica surge como um método não invasivo que mede a radiação reflectida pela superfície do sedimento. A absorção do sedimento e os pigmentos constituintes do biofilme resultam num espectro de reflectância particular, que pode ser utilizado para quantificar as concentrações de

pigmentos à superfície do sedimento (Méléder *et al.* 2003, Morris 2005). O espectro reflectido pela superfície do sedimento pode ser utilizado de forma quantitativa, através do cálculo de índices de biomassa (NDVI, IR-B, BG) (Morris 2005) ou qualitativamente discriminando os diferentes grupos de microalgas, com base na absorção dos pigmentos que os caracterizam (Paterson *et al.* 1998). Os trabalhos de Paterson *et al.* (1998) e Morris (2005) demonstraram que ao longo do período de emersão podem registar-se variações drásticas no espectro reflectido pelo sedimento em consequência dos movimentos migratórios verticais do MPB.

1.5. Objectivos

Os estímulos ambientais afectam consideravelmente o comportamento do MPB nas zonas intertidais. Particularmente, a irradiância representa um factor de controlo muito importante no comportamento migratório destes organismos. Este trabalho propõe-se a caracterizar a resposta migratória de biofilmes microalgais naturais a alterações na irradiância incidente. O estudo da resposta fototáctica migratória do MPB passa pela exploração do conceito de fotoprotecção e fotoregulação, que pode ser atribuído à migração vertical descendente, sob níveis de irradiância elevada. O presente estudo foi desenvolvido em três fases: (1) avaliação da eficiência de dois métodos não intrusivos (Fluorescência e Análise Espectral de Reflectância) para estimar a biomassa produtiva; (2) caracterização e monitorização da resposta fototáctica de MPB através da construção de curvas de fotoacumulação (biomassa vs. irradiância), relacionando a biomassa de superfície à irradiância incidente; e (3) pela aplicação das curvas de fotoacumulação a biofilmes de MPB com diferentes fracções de espécies móveis.

O trabalho divide-se em 5 partes. A primeira parte (ponto 1) corresponde a uma introdução geral que foca os aspectos mais significativos do MPB, em termos de ecologia e comportamento, bem como o papel desempenhado por estes organismos nos ecossistemas costeiros e estuarino, e a aplicabilidade de técnicas não destrutivas para estimar a biomassa superficial. O ponto 2 descreve as metodologias e os pressupostos aplicados no desenvolvimento do trabalho prático. Os resultados obtidos nas variantes do trabalho são apresentados em 3, com descrição de resultados típicos que exemplificam os resultados obtidos ao longo de todo o período experimental. O ponto 4 dá lugar à discussão do trabalho efectuado, relacionando os resultados do presente trabalho com os

trabalhos prévios de outros autores. A última parte, referente ao ponto 5, integra uma conclusão geral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

2.1.1. Enquadramento geográfico

A Ria de Aveiro (Figura 2.1) é um sistema estuarino, também descrito como laguna costeira (Cunha *et al.* 2003, Dias *et al.* 2000), localizado na Costa Atlântica Noroeste de Portugal (40° 38' N, 8° 44' W). Apresenta uma geometria complexa e irregular, caracterizada por estreitos canais e pela existência de zonas intertidais extensas e com significativo valor ecológico (Dias *et al.* 2000).

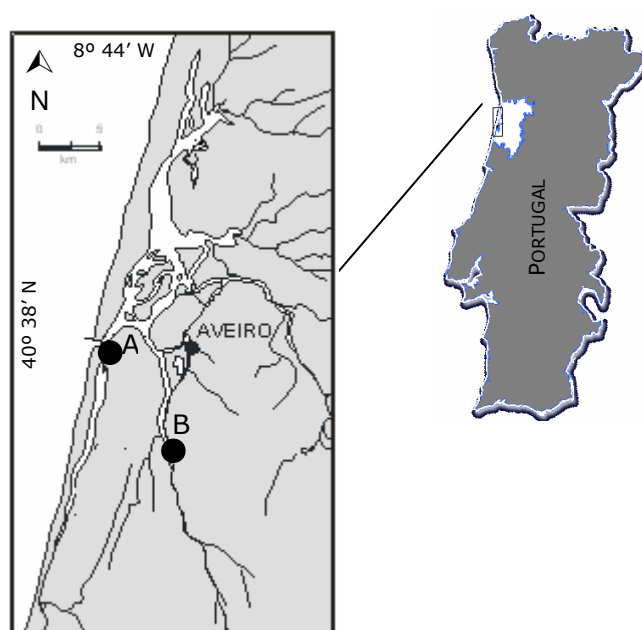


Figura 2.1. Localização e mapa da Ria de Aveiro (Aveiro, Portugal) com indicação das estações de amostragem (A) GE e (B) VA.

A Ria de Aveiro tem uma largura e comprimento máximos de 10 e 45 km respectivamente, sendo que a área total coberta durante a preia-mar é de 66 km² em águas mortas e 83 km² em águas vivas (Dias *et al.* 1999, Dias *et al.* 2000). A comunicação com o oceano processa-se através do canal da Barra, sendo a circulação de água no interior da Ria dominada pela propagação da maré, que sofre grande distorção desde a boca do estuário até ao fim dos canais, em consequência da geometria e batimetria de cada canal (Dias *et al.* 2003). A maré é do tipo semi-diurno, com amplitude média de aproximadamente 2 m, variando entre 0.6 m em maré morta e 3.2 m

em maré viva (Cunha *et al.* 2003, Dias *et al.* 2000). Os rios Vouga e Antuã são as principais fontes de água doce da Ria (Dias *et al.* 2000).

O presente estudo foi realizado em duas estações de amostragem: GE (40° 38' N, 8° 44' W), localizada na margem direita do Canal de Mira junto à Gafanha da Encarnação (Figura 2.1 A) e VA (40° 35' N, 8° 41' W), localizada próximo da Vista Alegre, num pequeno braço da margem esquerda do Canal de Ílhavo (Figura 2.1 B).



Figura 2.2. Estações de amostragem na Ria de Aveiro: (A) GE, no Canal de Mira e (B) VA, num braço do Canal de Ílhavo.

As estações de amostragem apresentam características distintas no que respeita à granulometria do sedimento, o que potencialmente se pode traduzir em diferenças na

abundância e composição das comunidades de MPB, nomeadamente na fracção móvel das espécies. VA apresenta sedimentos vasosos, com 97% das partículas de diâmetro inferior a 63 μm , enquanto que GE apresenta sedimento de areia vasosa com 45,3% partículas entre 63-125 μm e 42,7% inferiores a 63 μm (Seródio *et al.* 2003).

2.1.2. Colheita e processamento de amostras

O estudo foi realizado entre Novembro de 2004 e Abril de 2005, com a recolha de amostras de sedimento (Figura 2.3) durante o período de baixa-mar. As amostras de sedimento foram colhidas em *corers* cilíndricos de plástico, com 3.6 cm de diâmetro interno (Figura 2.3). Os *corers* foram fechados, com rolhas de cortiça, na extremidade inferior e transportados para o laboratório com o mínimo de perturbação.



Figura 2.3. Aspecto do procedimento de colheita de amostras de sedimento na Ria de Aveiro.

Posteriormente, as amostras foram seccionadas (Figura 2.4) no laboratório, utilizando anéis de plástico com 1 cm de altura e diâmetro igual ao dos *corers* de amostragem. Os anéis contendo as amostras foram conservados em caixas de Petri com água proveniente dos locais de amostragem, sendo que o nível de água nas caixas foi controlado de forma a não cobrir a superfície do sedimento, mas assegurando a manutenção do sedimento húmido.

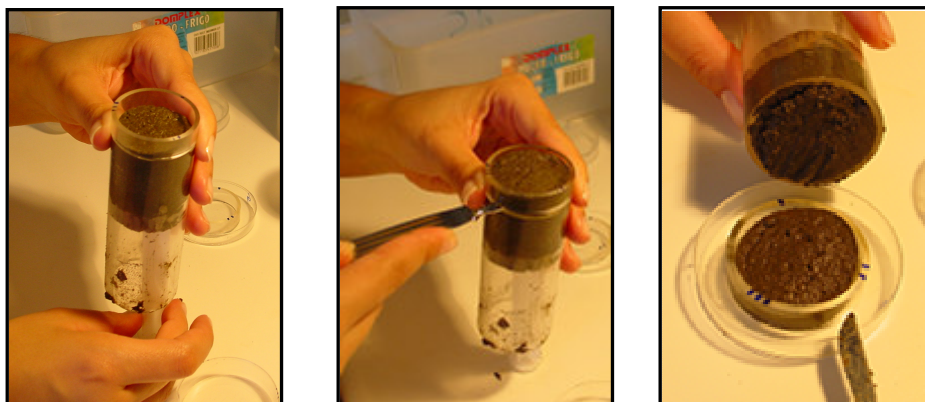


Figura 2.4. Aspecto do procedimento laboratorial efectuado para o seccionamento das amostras de sedimento.

Foram preparadas suspensões de microalgas a partir de um procedimento adaptado da técnica de “*lens tissue*” (Eaton e Moss, 1966) que se baseia no comportamento migratório de espécies de microalgas. Durante os períodos correspondentes à baixa-mar diurna, foram colocados pequenos quadrados de “*lens tissue*” (assegurando a cobertura total da área) sobre a superfície de sedimento, recolhido no início da baixa-mar nos locais de amostragem. As amostras foram mantidas no laboratório sobre uma luz branca, emitida a partir de uma lâmpada de halogéneo (Volpi Intralux 5000-1, Volpi, Suíça). As microalgas móveis foram recolhidas por ressuspensão (lavagem) do “*lens tissue*” em água filtrada, procedente dos locais de amostragem.

Sempre que necessário, foram ainda preparadas amostras de sedimento homogeneizado. O sedimento foi homogeneizado de forma a assegurar a distribuição vertical da chl *a*, por ressuspensão repetida de 2 mm de sedimento em água filtrada, proveniente dos locais de amostragem, e utilizando uma seringa (adaptado de Serôdio *et al.* 1997). Os 2 mm superficiais de sedimento foram previamente seccionados a partir de *corers* de sedimento intacto, recolhidos nos locais de amostragem durante o período de baixa-mar.

2.2. Fluorometria de pulso modulado

A aplicação da fluorometria PAM ao estudo do MPB veio permitir a caracterização dos padrões migratórios de comunidades microfitobênticas intactas de uma forma não

destrutiva (Serôdio *et al.* 1997). O suporte desta metodologia reside na detecção de variações na concentração de chl *a* na zona fótica do sedimento provocada pelas migrações verticais das microalgas (Serôdio *et al.* 1997, Kromkamp *et al.* 1998, Honeywill *et al.* 2002).

Os fluorómetros do tipo PAM medem a fluorescência emitida como resposta a um feixe de luz de excitação, que é feito incidir sobre a superfície de uma amostra através de um feixe de fibras ópticas. O mínimo (F_o) e máximo (F_m) de fluorescência da chl *a* são medidos pela aplicação de um pulso saturante, após um período de adaptação ao escuro.

No presente estudo foi utilizado um fluorómetro PAM constituído por uma unidade de controlo (PAM-Control Unit, Walz, Effeltrich, Alemanha) e por uma unidade de emissão-deteção WATER-EDF-Universal (Gademann Instruments GmbH, Würzburg, Alemanha) (Figura 2.5 A e B). O fluorómetro utiliza uma luz azul (LED com pico de emissão a 450nm) como fonte de luz de excitação, actínica e saturante, emitindo a uma frequência de 18 Hz para medição de F_o (ver notação dos parâmetros na Tabela 2.1) e 20 Hz para medição de F_m (Serôdio *et al.* 2004).

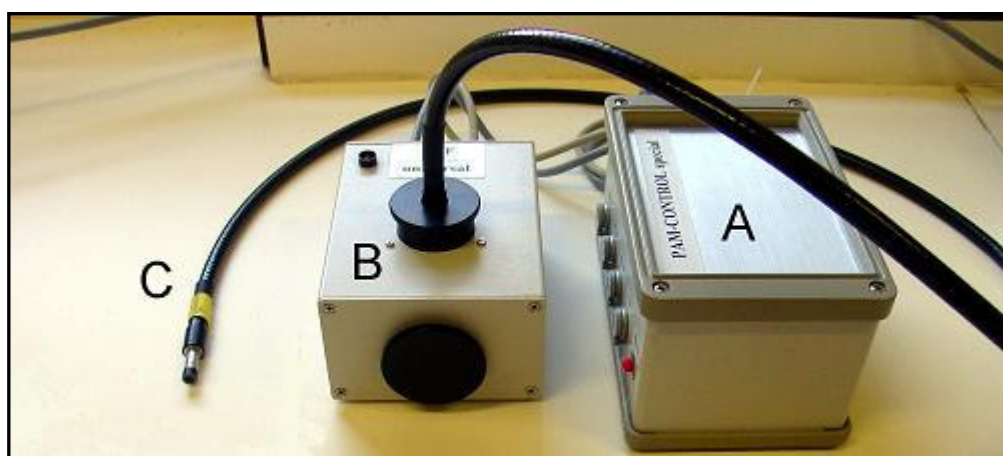


Figura 2.5. Aspecto do protótipo de fluorómetro modulado do tipo PAM. (A) unidade de controlo, (B) unidade de emissão-deteção WATER-EDF-Universal, (C) feixe de fibras ópticas com 6 mm de diâmetro.

Foi utilizada uma fibra óptica com 6 mm de diâmetro (Figura 2.5 C) para as medições efectuadas em sedimento intacto, sedimento homogeneizado e suspensões. A fibra óptica foi posicionada perpendicularmente à superfície das amostras de sedimento, a uma distância fixa de 1 mm, sendo a posição relativa da fibra óptica em relação à

superfície da amostra controlada por um micromanipulador (MM33, Märtzhäuer, Alemanha). As medições de suspensões de microalgas foram efectuadas acoplando a fibra óptica a uma cuvete de fluorescência (KS-101, Walz, Effeltrich, Alemanha).

Todas as amostras, com excepção das amostras colocadas no escuro (ver procedimento 2.5), foram adaptadas durante um período de 2 minutos ao escuro, antes da obtenção dos parâmetros de fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m) e da determinação do Rendimento Quântico Máximo do Fotossistema II (PSII, F_v/F_m). A diferença entre a fluorescência máxima e mínima após adaptação ao escuro é denominada de fluorescência variável (F_v) (Schreiber *et al.* 1995):

$$F_v = F_m - F_o \quad (1)$$

O Rendimento Quântico Máximo do PSII, F_v/F_m , foi calculado através da relação entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima após adaptação ao escuro (Genty *et al.* 1989, Schreiber *et al.* 1995):

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m \quad (2)$$

Em cada situação os parâmetros foram medidos e registados em 3 áreas distintas, não sobrepostas, da mesma amostra de sedimento (Figura 2.6).

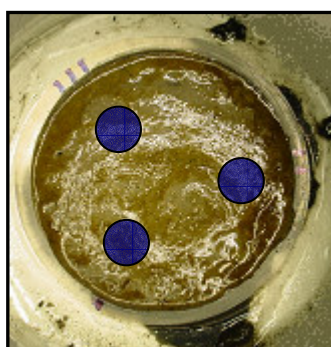


Figura 2.6. Áreas de medição num anel de sedimento amostrado.

Tabela 2.1. Parâmetros de fluorescência usados no presente estudo.

| Parâmetro | |
|-----------|---|
| F_o | Fluorescência mínima medida após adaptação da amostra ao escuro durante 2 min |
| F_m | Fluorescência máxima medida após adaptação da amostra ao escuro durante 2 min |
| F_v | Variável da fluorescência ($F_m - F_o$) em amostras adaptadas ao escuro |
| F_v/F_m | Rendimento quântico máximo do Fotossistema II (PSII) |

2.3. Análise espectral de reflectância

A análise espectral de reflectância e o uso do Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI) para análise quantitativa da biomassa constitui um método conhecido pela sua aplicação nas medições de biomassa ao nível da vegetação, que tem sido amplamente aplicado em investigação agrícola (Morris, 2005). As medições de reflectância foram realizadas em laboratório, com a aquisição de espectros de reflectância de amostras de sedimento usando um espectroradiómetro (USB2000-VIS-NIR, grating #3, Ocean Optics, Duiven, Holanda), acoplado a um computador, e controlado por um software operacional específico (OOIBase32) (Figura 2.7).

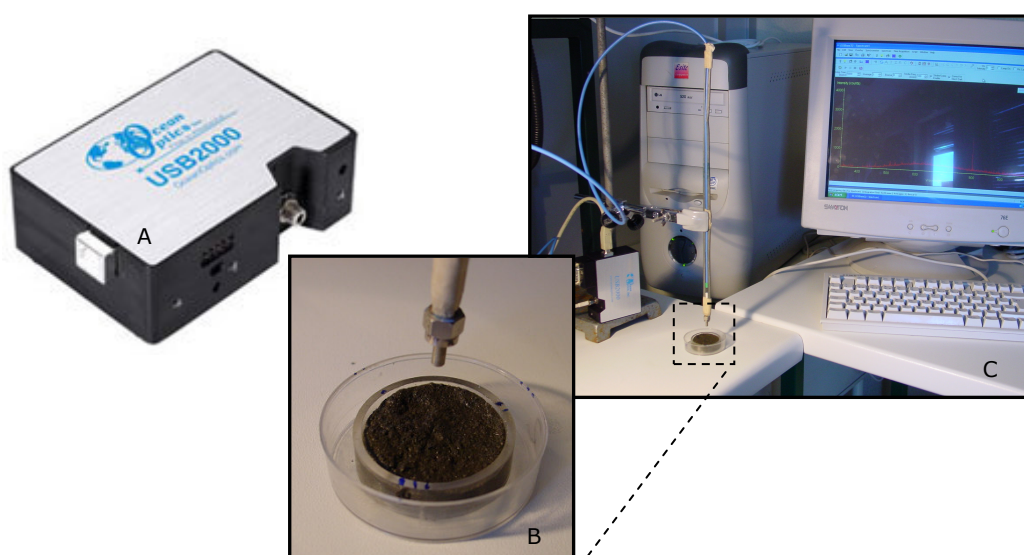


Figura 2.7. Sistema de medição de reflectância. (A) espectroradiómetro USB2000-VIS-NIR, (B) amostra de sedimento e fibra óptica, (C) aspecto global do sistema de medição: espectroradiómetro acoplado ao computador.

Os espectros de reflectância foram registados para o intervalo de comprimentos de onda correspondente a 350 -1000 nm. Foi utilizada uma resolução espectral de 0.38 nm e uma fibra óptica de 400 µm de diâmetro (modelo QP400-2-VIS/NIR-BX, Ocean Optics), posicionada perpendicularmente à superfície do sedimento. A fibra foi posicionada a uma distância fixa de 2.2 cm. Esta distância foi determinada de forma a proporcionar a monitorização da área superficial equivalente à da leitura da fibra óptica do PAM (6 mm).

O espectro de reflectância da superfície da amostra foi calculado a partir de (Jesus *et al.* 2005 *in press*):

$$\text{Reflectância} = (L_{u_s} - D_n) / (L_{u_d} - D_n) \quad (3)$$

onde L_{u_s} representa a radiação espectral emitida pela superfície do sedimento, L_{u_d} a reflectância de uma placa de referência de poliestireno expandido, equivalente ao branco obtido por um spectralon (Jesus *et al.* 2005 *in press*) e D_n o sinal electrónico da máquina medido no escuro.

Durante as medições, as amostras de sedimento e o painel de referência para a medição do espectro denominado branco foram expostos a uma irradiância constante de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ emitida por uma lâmpada de halógeno (luz branca; Volpi Intralux 5000-1, Volpi, Suíça). À semelhança das medições de fluorescência, em cada amostra foram efectuadas leituras independentes em três posições, não sobrepostas (Figura 2.6). Os espectros utilizados nos cálculos do índice de biomassa (NDVI 4) são resultado do valor médio de três espectros, medidos automática e consecutivamente em cada registo, num intervalo de 2.6 s.

A análise qualitativa para estimar a biomassa produtiva do MPB foi efectuada através do cálculo do Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI; Rouse *et al.* 1973).

$$\text{NDVI} = \frac{R_{750} - R_{675}}{R_{750} + R_{675}} \quad (4)$$

R_{750} e R_{675} representam a reflectância medida a 750 nm e 675 nm, respectivamente. Os valores de R_{750} foram calculados a partir da média dos valores registados para o intervalo 749.62-750.38 nm e para o cálculo de R_{675} foi utilizado o intervalo 674.62-675.38 nm.

2.4. F_0 e NDVI vs. biomassa produtiva

Foram estudadas, independentemente, as relações entre F_0 e o conteúdo em chl *a* do sedimento e entre NDVI e o conteúdo sedimentar de chl *a* de modo a confirmar a viabilidade do uso dos parâmetros F_0 e NDVI na monitorização das alterações na concentração de microalgas nas camadas superficiais do sedimento.

F_0 e NDVI foram medidos em amostras de sedimento verticalmente homogêneas, com diferentes conteúdos em chl *a*. As amostras foram preparadas por adição de conteúdos progressivamente mais concentrados de suspensões de microalgas a sedimento esterilizado (Seródio *et al.* 1997).

Considerando que o parâmetro de fluorescência F_0 pode ser afectado por efeitos fisiológicos consequentes da exposição à luz imediatamente antes do período de adaptação ao escuro, foi estudada a relação entre F_0 e a concentração de chl *a* em amostras pré-iluminadas. As amostras foram expostas, por períodos de 1h30, a diferentes níveis de luz (100, 500 e 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De forma a evitar a confusão de efeitos provocados por uma possível resposta migratória das microalgas à luz incidente, estas experiências foram efectuadas em suspensões. Depois de expostas 1h30, as suspensões foram adaptadas ao escuro, numa cuvete de fluorescência durante 2 min, procedendo-se de seguida à medição de F_0 .

2.4.1. Quantificação da clorofila *a*

As amostras utilizadas para o estudo das relações F_0 vs. chl *a* e NDVI vs. chl *a* foram sujeitas a um procedimento para quantificação da chl *a* pelo método de Lorenzen (1967), com aplicação das adaptações propostas por Plante-Cuny (1974) referentes ao teor em água do sedimento. A extracção ocorreu em solução aquosa de acetona a 90%, durante 24h, com manutenção da amostra no escuro e no frio (4°C). Após este período procedeu-se à quantificação espectrofotométrica da chl *a* em solução, com a leitura da absorvância das amostras a 750 nm (valor da turbidez) e a 665 nm (pico de absorção chl *a*) (Brotas *et al.* 1995).

2.5. Resposta fototáctica: curvas de fotoacumulação

A resposta fototáctica do MPB foi estudada através da exposição de amostras de sedimento a diferentes níveis de irradiância e pela monitorização das alterações induzidas na biomassa produtiva através da medição de F_0 e NDVI (Figura 2.8). Os resultados destas experiências foram usados na construção de curvas de fotoacumulação (biomassa vs. irradiância), que resumem a resposta migratória em função da irradiância incidente.

Durante o período coincidente com o início da baixa-mar no local de colheita as amostras foram expostas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 1h30, de forma a induzir a migração das microalgas móveis para a superfície do sedimento. Após este período as amostras foram distribuídas por sistemas de iluminação, com diferentes níveis de irradiância, durante um intervalo de tempo de 3-4 horas, durante o qual a reflectância espectral e F_0 foram registadas a cada 20 min. Cada amostra foi exposta separadamente a um nível de irradiância constante durante este período. Uma das amostras foi transferida para o escuro ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) onde foi mantida durante um período equivalente, com a respectiva monitorização de reflectância e F_0 , a cada 20 min.

As amostras foram expostas a uma luz actínica branca emitida por uma lâmpada de halogéneo (Volpi Intralux 5000 -1, Volpi, Suíça) e transmitida à amostra por uma fibra óptica acoplada num anel de luz com um diâmetro de 5 cm (Standard Ringlight, Volpi, Suíça) (Figura 2.9). A utilização do anel de luz permitiu a distribuição homogénea da luz no campo sobre a amostra. Cada amostra foi colocada no centro do anel de luz, a uma distância vertical ajustada de acordo com a irradiância incidente desejada. A irradiância incidente na superfície de cada amostra foi monitorizada por um micro-sensor PAR (Spherical MicroQuantum Sensor, US-SQS/W, Walz).

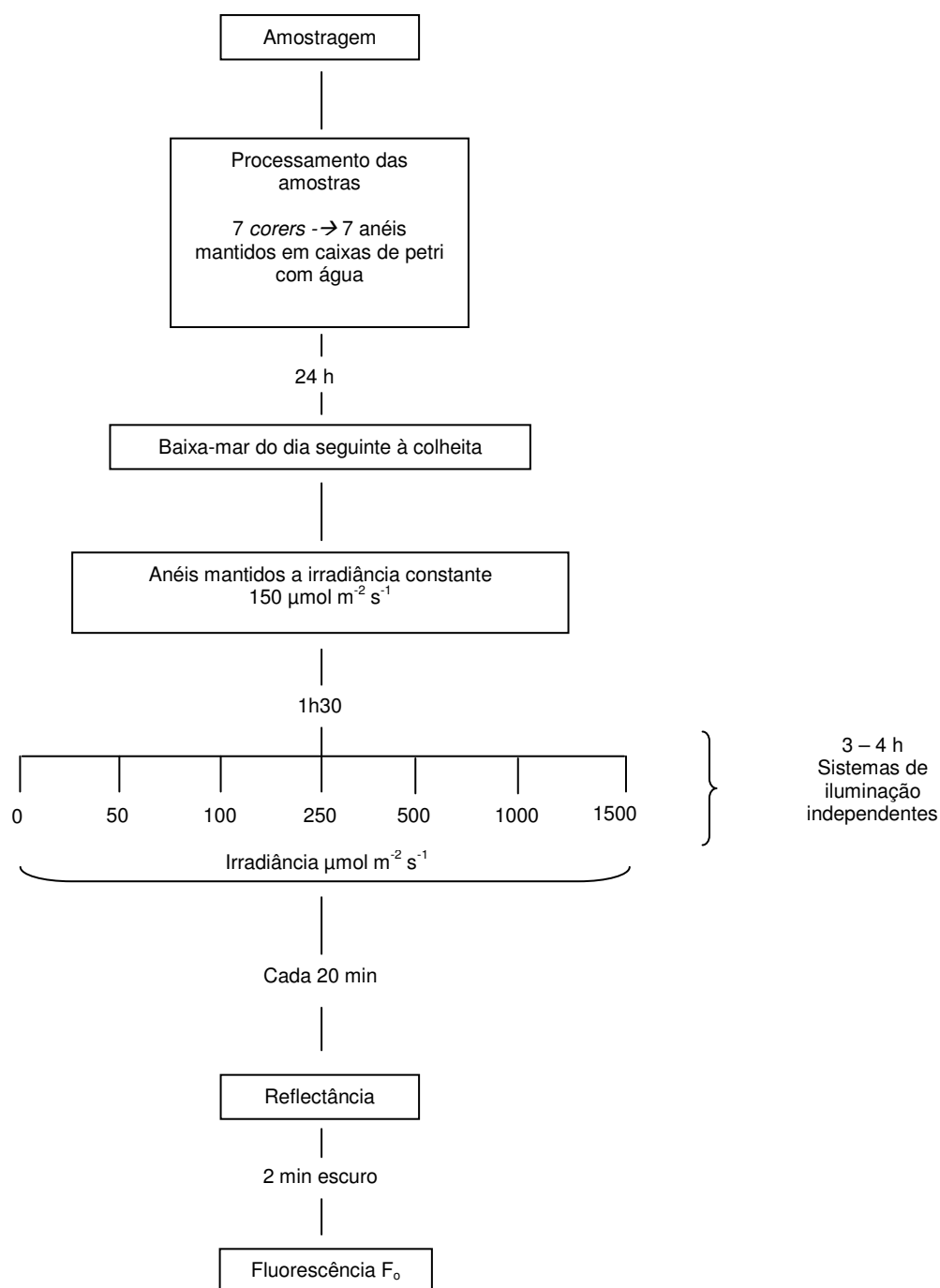


Figura 2.8. Representação esquemática do protocolo experimental.

Foram utilizados seis sistemas de iluminação independentes para simultaneamente, expor cada uma das 6 amostras de sedimento aos seguintes níveis de irradiância: 50, 100, 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na execução da experiência,

para medição dos parâmetros, cada amostra foi transportada, a cada 20 minutos, com o mínimo de distúrbio até às fibras ópticas de medição, quer de reflectância quer de fluorescência. Os valores de F_0 e NDVI obtidos foram normalizados relativamente aos últimos valores registados no período inicial em que as amostras estiveram, simultaneamente, expostas à mesma luz baixa ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de indução da migração.

Paralelamente à execução das experiências, em alguns dias, foram executadas fotografias ao microscópio óptico da superfície de cada amostra de sedimento.

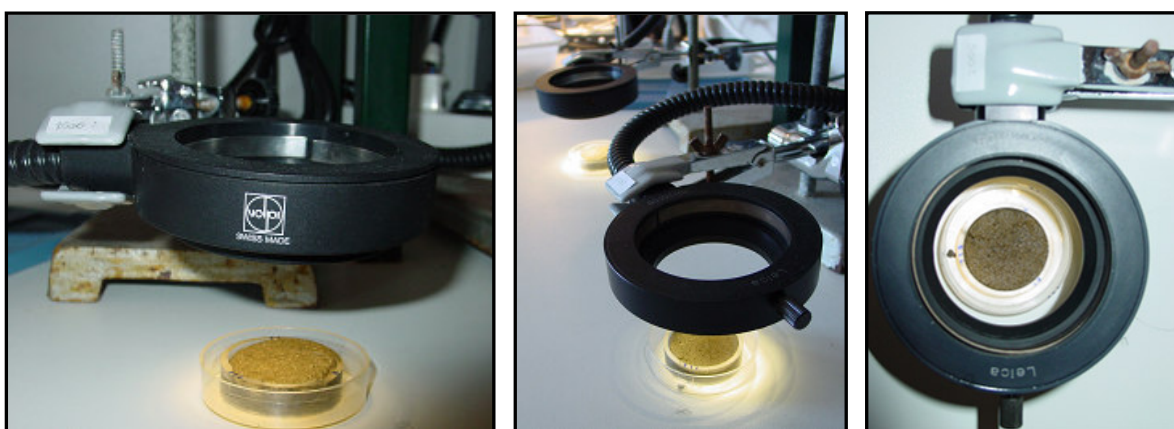


Figura 2.9. Aspecto do sistema de iluminação utilizado no protocolo experimental.

2.6. Composição taxonómica

Após a realização do procedimento experimental, para construção das curvas de fotoacumulação, foi seccionado 1 mm (superficial) de cada amostra de sedimento de forma a proceder à determinação da composição taxonómica. A amostra de sedimento obtida do 1º mm foi diluída em água filtrada, proveniente do local de amostragem. Os preparados de sedimento diluídos foram fixados em 1% v/v de formaldeído (gluteraldeído). As amostras foram observadas ao microscópio óptico (10x, 40x) em câmara de Sedgewick-Rafter (Electron Microscopy Sciences) (Figura 2.10), a fim de determinar a abundância relativa dos grupos taxonómicos principais (Diatomáceas, Euglenófitas, Cianobactérias) por contagem, até um total de 400 células.

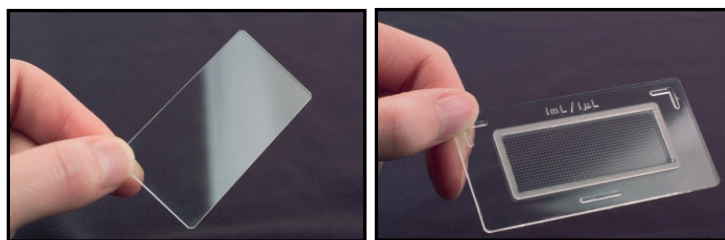


Figura 2.10. Câmara de Sedgewick-Rafter usada para a contagem de células.

A identificação de diatomáceas foi realizada em preparações microscópicas definitivas, preparadas por oxidação de sub-amostras do 1º mm de sedimento, utilizando ácido nítrico e dicromato de potássio para eliminar a matéria orgânica. Nas amostras de GE, para acelerar o processo de degradação do sedimento mais grosseiro, foram adicionadas 4 gotas de ácido clorídrico (1 M). As valvas limpas foram montadas em Naphrax (Thornton *et al.* 2002). As espécies foram identificadas seguindo as descrições de Bourrelly (Bourrelly 1981), Hartley *et al.* (Hartley *et al.* 1996), Krammer e Lange-Bertalot (Krammer e Lange-Bertalot 1986), Krammer e Lange-Bertalot (Krammer e Lange-Bertalot 1988), Peragallo e Peragallo (Peragallo e Peragallo 1897) e Witkowski *et al.* (Witkowski *et al.* 2000).

2.7. Análise estatística

A significância das regressões lineares entre a chl *a* e os parâmetros F_o e NDVI foi testada utilizando o cálculo de probabilidades para correlações do software STATISTICA 6.0. Foi utilizado o mesmo software para a aplicação de análise de covariância (ANCOVA) à relação entre F_o e a concentração de chl *a* para diferentes níveis de irradiância. Sendo a homogeneidade dos declives um pressuposto da ANCOVA foi realizado um teste-F preliminar utilizado para comparar os declives das regressões lineares. Posteriormente, foi testada a hipótese de haver diferenças significativas na origem (Sokal e Rohlf 1981).

3. RESULTADOS

3.1. F_o , NDVI vs. biomassa superficial

Foram verificadas experimentalmente relações lineares entre o conteúdo em chl *a* no sedimento e F_o e NDVI, o que permite atribuir as variações de F_o e NDVI a alterações directamente proporcionais na concentração de biomassa à superfície do sedimento (Figura 3.1). Ambos os parâmetros estão positivamente correlacionados com o conteúdo em chl *a*. Na relação F_o vs. chl *a* 93.2% da variação de F_o foi explicada pela variação no conteúdo de chl *a* enquanto que 88.1% da variação de NDVI foi explicada pela variação do conteúdo em chl *a*.

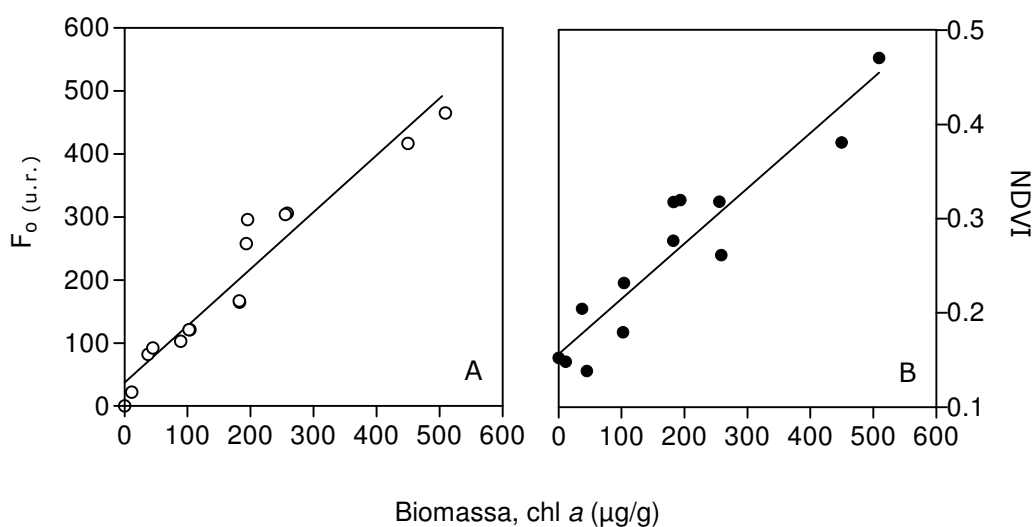


Figura 3.1. Regressão linear entre a biomassa superficial ($\mu\text{g chl } a / \text{g}$ sedimento seco) e (A) a fluorescência da chl *a* após adaptação ao escuro (F_o , unidades relativas; $r^2=0.932$, $p<0.001$, $n=15$) e (B) NDVI ($r^2=0.881$, $p<0.001$, $n=13$).

3.1.1. Efeito da pré-iluminação na relação F_o vs. chl *a*

Foram encontradas relações lineares, altamente significativas, entre F_o e a concentração de chl *a* em suspensões de microalgas previamente expostas a diferentes níveis de irradiância (Figura 3.2). Sob irradiância de 500 ($r^2=0.949$ $p<0.001$) e 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($r^2=0.974$ $p<0.001$) a relação linear observada foi mais forte do que sob 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($r^2=0.867$ $p<0.01$).

A relação F_o vs. chl a não foi substancialmente afectada pela exposição prévia à luz, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os declives e as ordenadas na origem das equações da regressão linear (ANCOVA; $p=0.827$ e $p=0.474$, respectivamente).

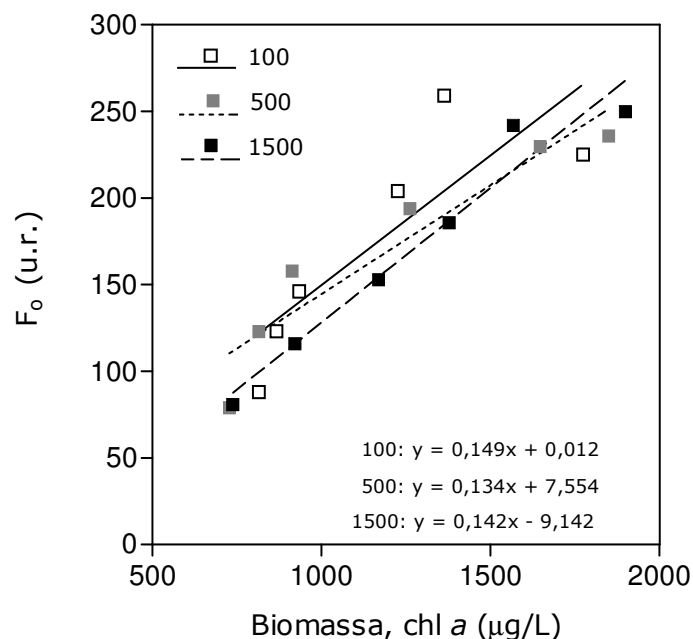


Figura 3.2. Efeito da pré-iluminação na relação entre a fluorescência da chl a após adaptação ao escuro (F_o) e a biomassa (concentração de chl a $\mu\text{g/L}$), em suspensões de microalgas. Os números representam os diferentes níveis de irradiação aos quais as amostras foram expostas antes das medições ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para cada nível foi efectuada uma regressão linear cuja equação está representada no gráfico.

3.2. Resposta fototáctica: fluorescência (F_o)

A resposta fototáctica do MPB foi monitorizada ao longo de períodos coincidentes com a baixa-mar, seguindo a evolução do parâmetro de fluorescência F_o . A exposição dos biofilmes de microalgas aos diferentes níveis de irradiação resultou numa gama considerável de respostas migratórias. A Figura 3.3 mostra a variação típica de F_o ao longo do tempo sob diferentes níveis de irradiação em amostras de VA. Os resultados

foram registados depois de um pré-período de 1h30 em que a totalidade das amostras estiveram sob o mesmo nível de irradiância, assegurando a formação de um biofilme.

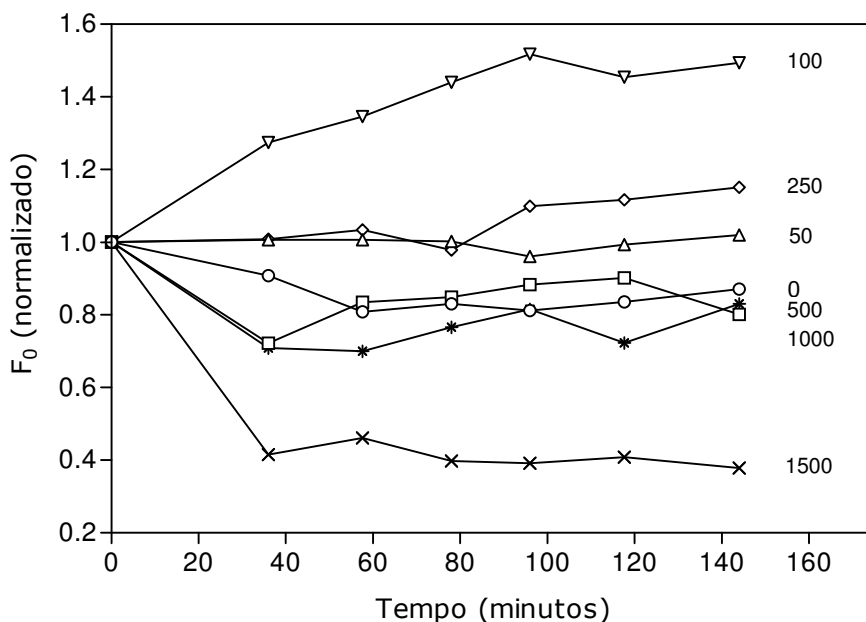


Figura 3.3. Resposta migratória fototática típica de MPB, com variação de F_0 , para diferentes níveis de irradiância, em amostras intactas de sedimento de VA, durante um período coincidente com baixa-mar. As amostras foram pré-expostas a uma irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os números representam a irradiância prévia a cada medição de F_0 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). F_0 foi normalizado aos valores iniciais, medidos imediatamente antes da separação das amostras pelos diferentes níveis de irradiância (tempo = 0).

Sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se um aumento consistente de F_0 , indicativo do aumento e acumulação de biomassa à superfície do sedimento por migração ascendente. Nas amostras expostas a irradiâncias de 50 e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se uma estabilização dos valores de F_0 relativamente aos valores iniciais, contudo a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocorreu um incremento de F_0 após 80 minutos. Sob irradiâncias superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, houve uma resposta migratória negativa, visível no decréscimo de F_0 . O decréscimo é proporcional ao aumento do nível de irradiância. Situação similar ocorreu na amostra colocada no escuro ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que apresentou uma redução expressiva da biomassa superficial, contudo menor do que a registada para irradiâncias elevadas (1000 e $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foi observado que a resposta migratória descendente, sob irradiância elevada, foi mais rápida que a resposta migratória ascendente, sob irradiância baixa; sob irradiância de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a

variação de F_o substancial ocorreu em apenas 40 minutos, enquanto que para irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o incremento de biomassa prolongou-se por mais de 100 minutos.

O estudo da resposta fototáctica foi acompanhado pela análise à variação do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), observada nas mesmas amostras, no mesmo período de tempo (Figura 3.4). Sob irradiâncias entre 0 e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se F_v/F_m de aproximadamente 0.7. Em irradiâncias incidentes superiores a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se uma redução acentuada de F_v/F_m , acompanhando as variações de F_o . Esta diminuição ocorreu num curto espaço de tempo (aproximadamente 30 a 40 minutos), após passagem de níveis de irradiância baixa ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no pré-período de tratamento) para alta (500 , 1000 e $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

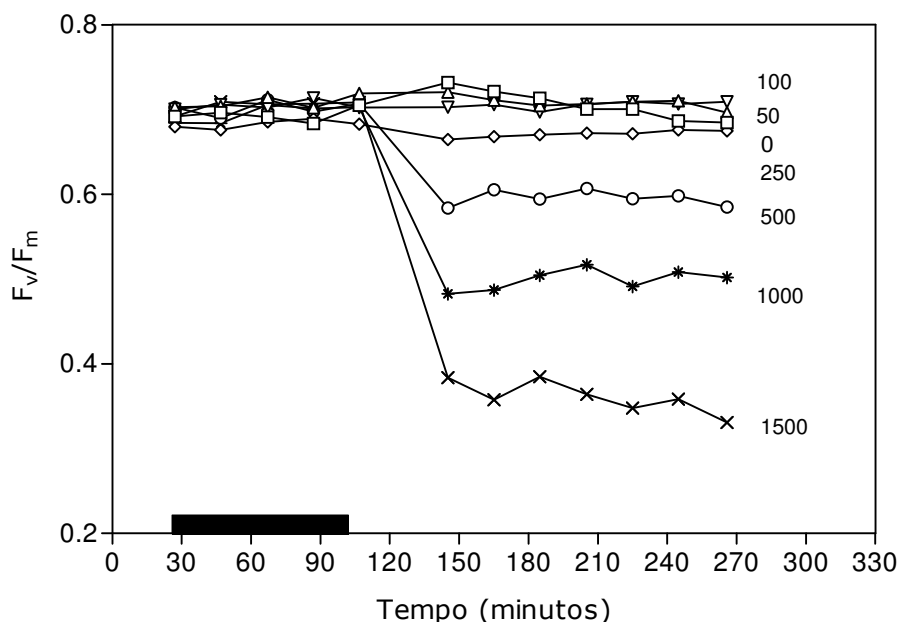


Figura 3.4. Variação típica de F_v/F_m , para diferentes níveis de irradiância, em amostras de sedimento de VA. A barra preta horizontal indica o pré-período de tratamento em que a totalidade das amostras estiveram sujeitas ao mesmo nível de irradiância ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e os números representam a irradiância prévia a cada medição de F_v/F_m ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As amostras correspondem às da Figura 3.3.

Nas amostras expostas a irradiância de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, registou-se um decréscimo de F_v/F_m de 0.7 para 0.4, em aproximadamente 30 minutos, enquanto que para as amostras sujeitas a 500 e $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no período equivalente, o

decréscimo foi menor, sendo de 0.15 para as amostras a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de 0.2 para as amostras sujeitas a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.1. Curvas de fotoacumulação (biomassa vs. irradiância)

A resposta fototática do MPB foi resumida pela construção de curvas de fotoacumulação, ou biomassa vs. irradiância, que relacionam a biomassa superficial e a irradiância incidente à superfície do sedimento. Criaram-se curvas de fotoacumulação típicas para a VA, que representam o comportamento das amostras no período de desenvolvimento do trabalho.

As curvas de fotoacumulação da Figura 3.5 foram obtidas após estabilização da resposta migratória, aproximadamente 90 minutos depois de as amostras serem repartidas pelos diferentes níveis de irradiância. As curvas apresentaram um pico claro sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondente ao valor máximo de F_o .

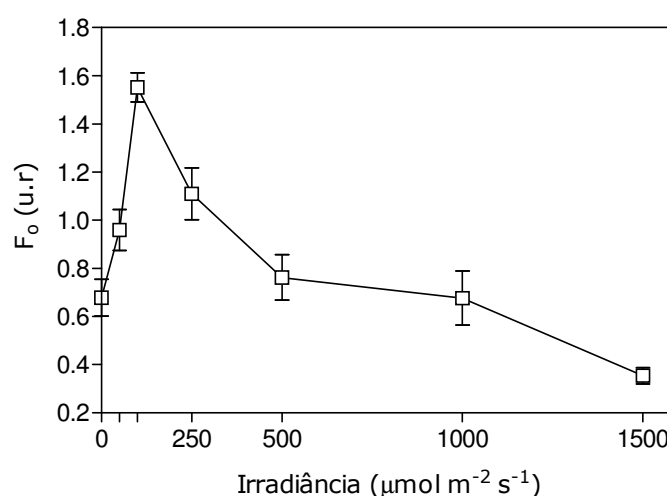


Figura 3.5. Curva típica de fotoacumulação de VA. Relação entre a biomassa superficial (F_o) e a irradiância incidente, construída com base na Figura 3.3. Exemplo de curva adquirida aproximadamente 90 minutos após a exposição a diferentes níveis de luz. As barras verticais representam 1 desvio-padrão.

Sob irradiância de $50 - 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ registou-se um incremento de F_o , indicativo de uma resposta fototática positiva das microalgas (migração ascendente). Em oposição, a transição para o escuro induziu uma resposta migratória negativa. O aumento da irradiância ($>100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à superfície do sedimento é proporcional a um

decréscimo da biomassa (F_0), correspondente à diminuição na concentração de MPB nas camadas superficiais da amostra. F_0 diminuiu expressivamente para irradiâncias superiores a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, indicativo de uma resposta fototáctica negativa expressa por migração descendente. Os valores de F_0 registados para os níveis de irradiância equivalentes a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram semelhantes ou inferiores aos verificados para a amostra colocada no escuro. Observou-se sob $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ um valor de biomassa inferior ao verificado nas amostras colocadas no escuro, demonstrando que irradiâncias muito elevadas podem ter uma influência mais significativa na biomassa superficial do que a ausência de irradiância.

No decorrer das diferentes experiências foram efectuadas fotografias da superfície do sedimento de amostras sob três níveis de irradiância diferentes, ao microscópio óptico. As fotografias permitiram verificar as diferenças significativas de coloração à superfície do sedimento. Com o aumento do nível de irradiância de 100 para $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.6) é visível uma diminuição expressiva da cor do sedimento.

Em situações pontuais houve curvas de fotoacumulação que apresentaram excepções às curvas típicas, observando-se uma inflexão na fase final da curva e uma deslocação do pico máximo de biomassa (Figura 3.7). Estas curvas apresentaram um incremento de F_0 sob irradiâncias baixas, correspondente a aumento de biomassa, que se prolongou até $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (pico de biomassa registado para esta irradiância). Observou-se uma fase de decréscimo da biomassa, menos acentuada do que a registada nas restantes curvas, e que ocorreu apenas até irradiâncias de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foi ainda observado nestas curvas uma inflexão expressiva, correspondente a um novo incremento de F_0 para irradiâncias superiores a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

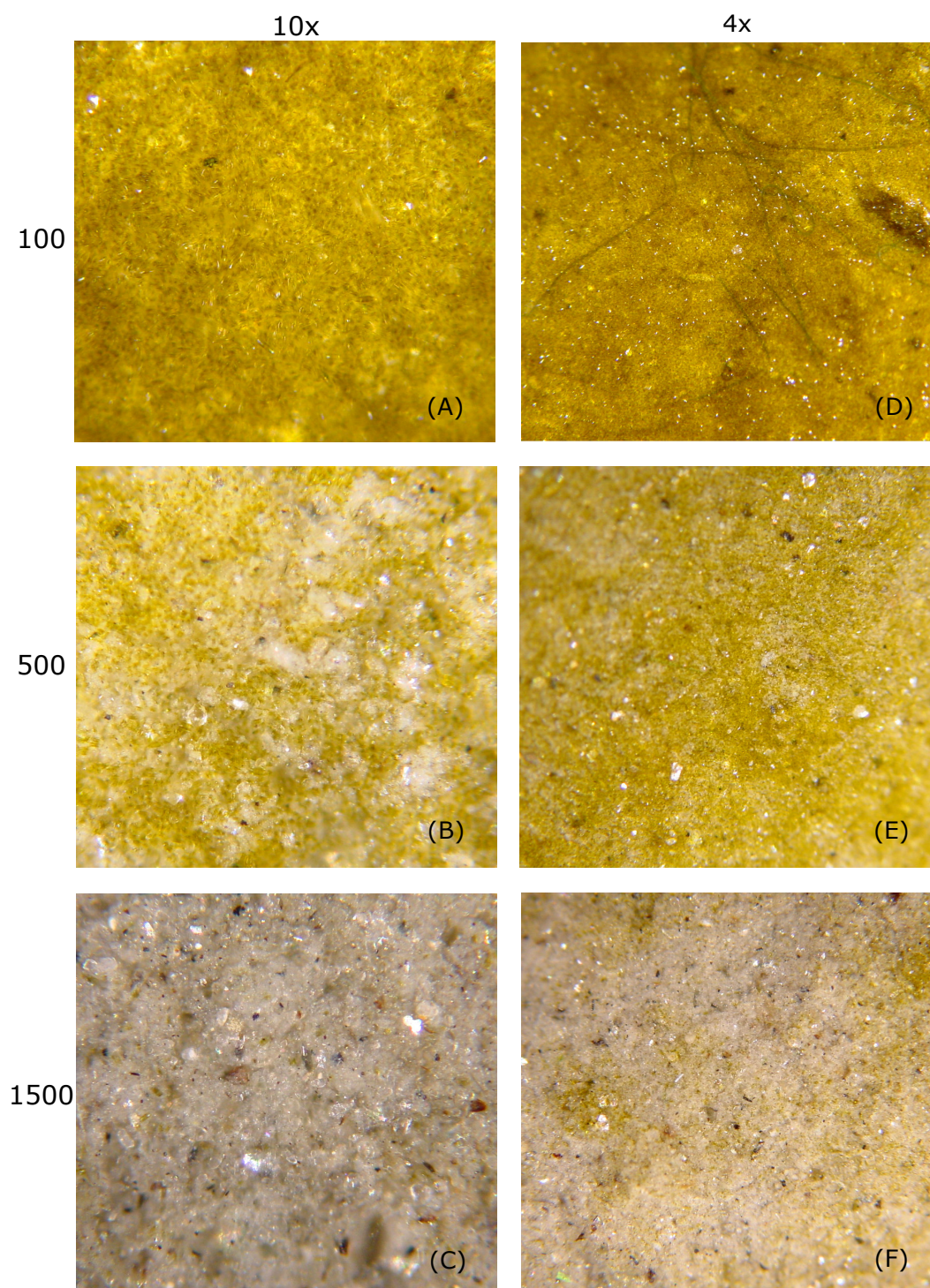


Figura 3.6. Fotografias da superfície do sedimento ao microscópio óptico, no decorrer do estudo da resposta fototáctica do MPB. A, B e C foram tiradas com objectiva de 10x e D, E e F de 4x. A e D representam amostras sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, B e E de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e C e F de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

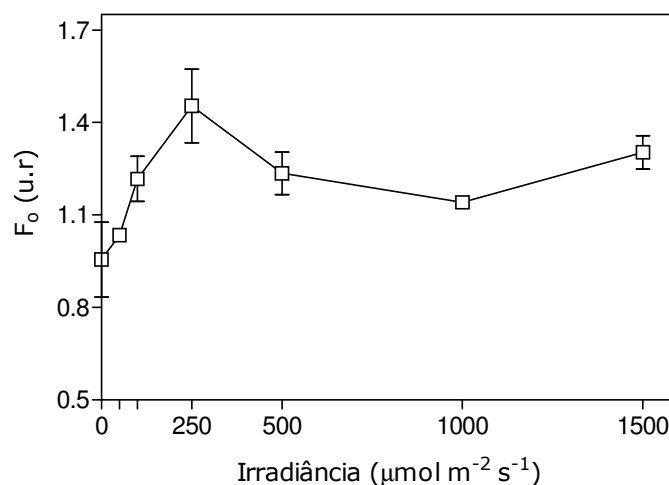


Figura 3.7. Curva de fotoacumulação de VA com inflexão final. Curva adquirida em condição semelhante à verificada na legenda da Figura 3.5. As barras verticais representam 1 desvio-padrão.

Paralelamente às curvas de fotoacumulação, foram criadas curvas para sintetizar o comportamento do F_v/F_m em função do nível de irradiância incidente na amostra. Verificou-se uma estabilização inicial em que o F_v/F_m se manteve em valores elevados (± 0.7) e um decréscimo acentuado do rendimento quântico máximo para irradiâncias iguais ou superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.8).

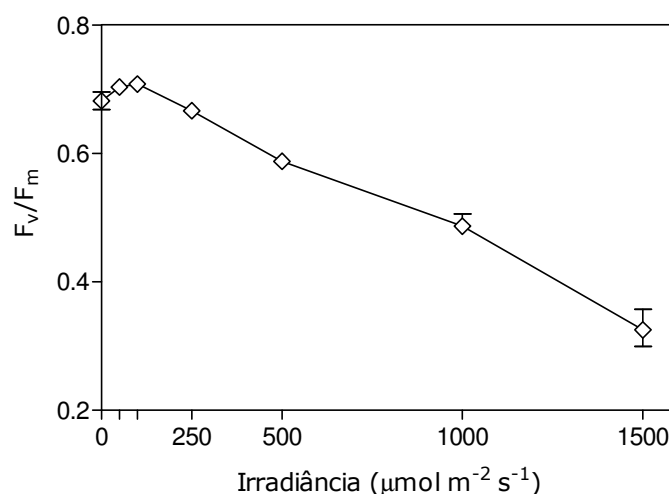


Figura 3.8. Curva F_v/F_m em função da irradiância em amostras de VA. Exemplo de curva construída com base na Figura 3.3. As barras verticais representam 1 desvio-padrão.

As amostras monitorizadas para a construção das curvas de fotoacumulação foram analisadas quantitativa e qualitativamente relativamente à composição taxonómica (Figura 3.9). Registaram-se contagens de células em amostras sob três níveis de irradiância e foi realizada uma análise taxonómica das diatomáceas presentes em cada amostragem, depois de demonstrado que as diatomáceas representavam o grupo dominante em todas as amostras (Tabela 3.1). A concentração de células superficial, relativa ao primeiro milímetro de sedimento de amostras de VA, mostrou uma redução do número de células proporcional ao decréscimo de F_0 sob irradiâncias elevadas. É evidente o decréscimo no número de células da amostra exposta a irradiância de 100 para a de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (de 2,9 para $2,6 \times 10^6$ células/mL, respectivamente, na Figura 3.9 A).

Tabela 3.1. Abundância relativa dos diferentes grupos presentes nas amostras observadas de VA.

| | Nível de Irradiância | | |
|----------------|----------------------|-------|-------|
| | 100 | 500 | 1500 |
| Diatomáceas | 99,2% | 98,7% | 98,5% |
| Euglenófitas | 0,2% | 0,5% | 0,6% |
| Cianobactérias | 0,5% | 0,6% | 0,5% |
| Outras | 0,1% | 0,2% | 0,4% |

O estudo complementar de identificação das diatomáceas presentes em cada amostra de sedimento demonstrou a dominância relativa das espécies *Navicula phyllepta* Kützinger, *Navicula gregaria* (Kützinger) Grunow, *Parlibellus crucicula* (W. Smith) Witkowski, Lange-Bertalot e Metzeltin e *Gyrosigma fasciola* (Ehrenberg) Griffth e Henfrey em amostras de VA (Figura 3.9 B, Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Abundância relativa (%) de todos os taxa identificados em VA.

| Taxa | VA | | |
|--|------|------|------|
| | 100 | 500 | 1500 |
| <i>Achnanthes</i> sp. | | 1,6 | 1,7 |
| <i>Amphora coffeaeformis</i> (Agardh) Kützing | 2,2 | 2,9 | 2,7 |
| <i>Amphora</i> sp. | 1,7 | 3,9 | 2,2 |
| <i>Cocconeis scutellum</i> Ehrenberg | 0,7 | 6,2 | 5,2 |
| <i>Diploneis</i> sp. | 0,5 | 1,0 | 2,0 |
| <i>Entomoneis alata</i> (Ehrenberg) Ehrenberg | 3,4 | | 3,7 |
| <i>Entomoneis paludosa</i> (W.Smith) Reimer | 1,5 | 1,0 | 2,0 |
| <i>Gyrosigma acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst | | | 1,7 |
| <i>Gyrosigma fasciola</i> (Ehrenberg) Griffith & Henfrey | 5,9 | 4,7 | 8,0 |
| <i>Navicula gregaria</i> Donkin | 26,8 | 13,7 | 5,2 |
| <i>Navicula phyllepta</i> Kützing | 30,2 | 26,2 | 24,2 |
| <i>Nitzschia acuminata</i> (W. Smith) Grunow | | 2,8 | 0,5 |
| <i>Nitzschia compressa</i> (Bailey) C.S. Boyer | | 1,6 | 1,7 |
| <i>Nitzschia constricta</i> (Kützing) Ralfs | 1,5 | 9,3 | |
| <i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow | 0,7 | 13,0 | 13,2 |
| <i>Nitzschia perspicua</i> Cholnoky | | 3,9 | 4,7 |
| <i>Nitzschia sigma</i> (Kützing) W. Smith | | 0,3 | 1,2 |
| <i>Parlibellus crucicula</i> (W.Smith) Witkowski, Lange-Bertalot e Metzeltin | 11,3 | 11,7 | 9,5 |
| <i>Pleurosigma angulatum</i> (Queckett) W. Smith | 2,2 | 3,6 | 4,5 |
| <i>Stauroneis salina</i> W. Smith | 6,9 | | |
| <i>Surirella</i> sp. | | 1,6 | 1,2 |
| Outras | 4,4 | 5,7 | 4,7 |

Verificou-se uma clara diminuição de *N. gregaria* da amostra exposta a irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a amostra sob $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta redução ocorre igualmente para outras espécies, embora com menor expressão. Por oposição, *Nitzschia frustulum* apenas aparece nas amostras sob irradiâncias elevadas (500 e $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Em paralelo, há espécies que mantém uma percentagem de ocorrência equivalente entre os diferentes níveis, tais como *Parlibellus crucicula*.

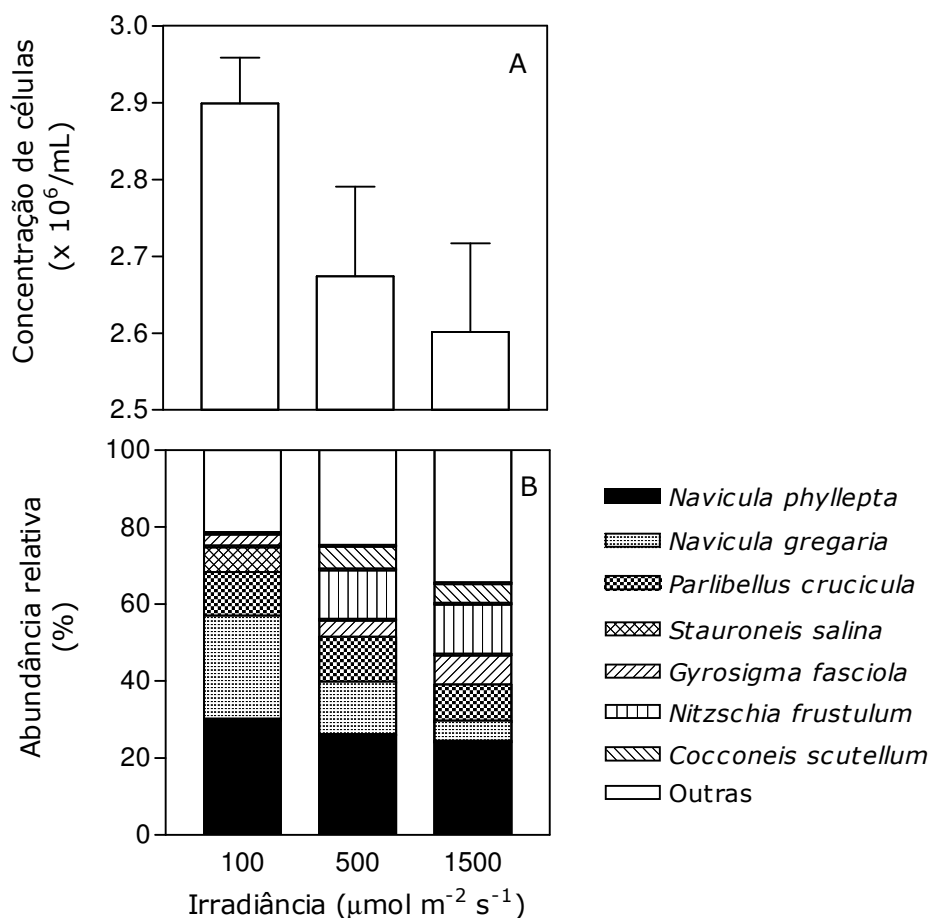


Figura 3.9. Concentração de microalgas (A) e abundância relativa dos diferentes taxa de diatomáceas (B) no primeiro milímetro de sedimento de amostras de VA, após exposição a diferentes irradiâncias. Amostras correspondentes à Figura 3.5. Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 erro-padrão. Apenas estão representados os taxa com abundância relativa > 5%.

3.3. Resposta fototática: reflectância espectral (NDVI)

Os espectros de reflectância foram adquiridos à superfície das amostras de sedimento ao longo do período de exposição de cada amostra a determinado nível de irradiância. A Figura 3.10 mostra quatro dos espectros obtidos para uma amostra exposta a uma irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante um período coincidente com a baixa-mar, em intervalos regulares de 20 minutos. O primeiro registo foi efectuado para o tempo 0 ($t=0$) de exposição, i.e. no início do período de baixa-mar e no momento em que a amostra passa a ser exposta a um tratamento de luz constante.

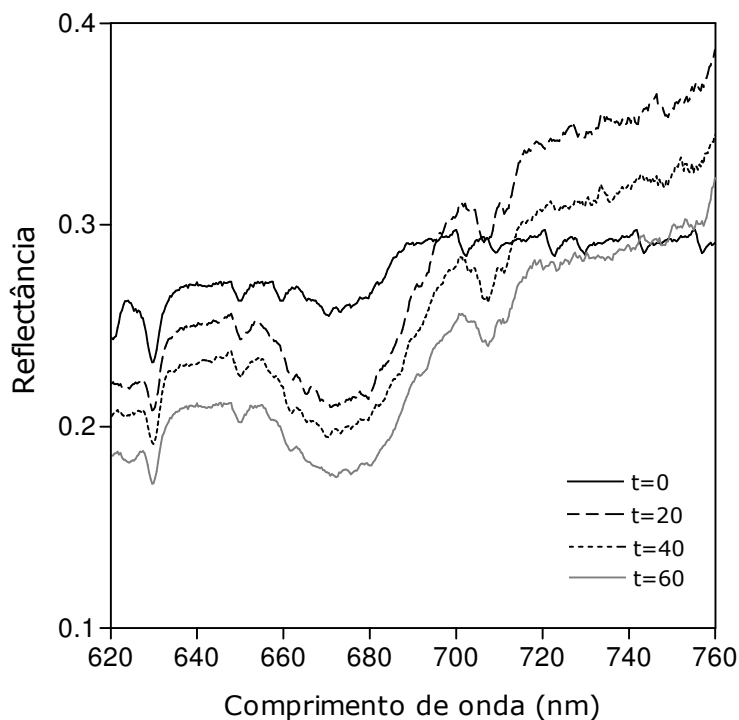


Figura 3.10. Exemplo de série temporal de espectros de reflectância adquiridos a cada 20 minutos à superfície de uma amostra de sedimento, após o início da baixa-mar. Amostra exposta a irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O sinal emitido à superfície do sedimento a $t=0$ mostrou a ausência de absorção expressiva para comprimentos de onda correspondentes à absorção da chl *a* (673-675 nm). A segunda aquisição foi efectuada 20 minutos depois ($t=20$) e mostrou um decréscimo significativo da reflectância na zona de absorção (referente à chl *a*) indicando a presença de microalgas na camada superficial do sedimento. Os espectros seguintes, a $t=40$ e $t=60$ acentuam o decréscimo de reflectância. Para comprimentos de onda superiores a 700 nm verificou-se um incremento considerável da reflectância.

A construção de curvas de fotoacumulação a partir de NDVI demonstrou um padrão similar ao registado nas curvas construídas com base no parâmetro de fluorescência F_0 . A relação biomassa vs. irradiância, monitorizada por fluorescência e reflectância espectral (representada pelo NDVI) é comparada na Figura 3.11.

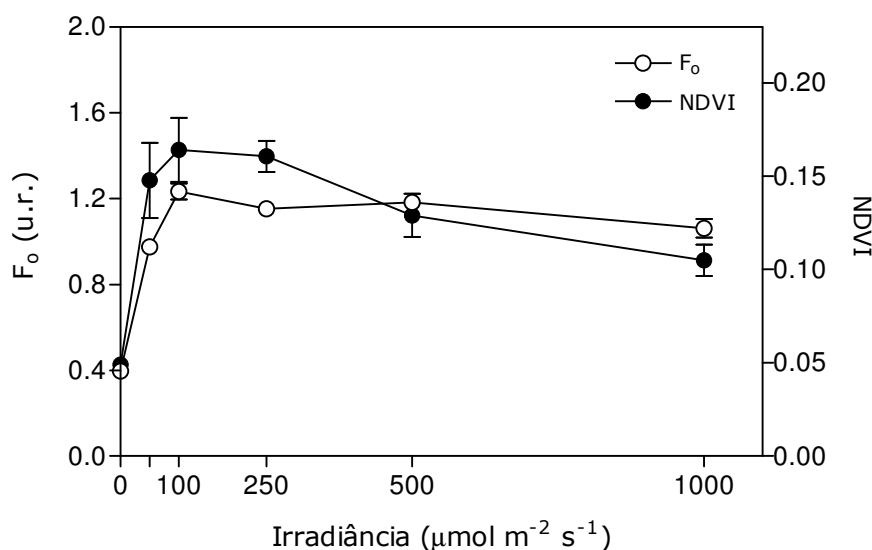


Figura 3.11. Comparação de curvas de fotoacumulação construídas a partir de F_0 e NDVI, em amostras de VA. Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 desvio-padrão.

As curvas apresentaram um padrão bifásico semelhante, com uma fase inicial de aumento de biomassa sob irradiâncias de 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que culmina num pico simétrico estabilizado sob irradiâncias de 100-250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma fase final de decréscimo de biomassa para irradiâncias superiores a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ambas as curvas apresentaram decréscimos de biomassa menos acentuados que o incremento inicial da curva. A curva de fotoacumulação baseada na relação NDVI vs. irradiância mostrou um decréscimo de biomassa mais acentuado para irradiâncias elevadas, que o demonstrado para a mesma amostra no período equivalente, pela curva de fotoacumulação F_0 vs. irradiância, como é visível na Figura 3.11 para os níveis de irradiância de 500 e 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.4. Aplicação das curvas de fotoacumulação na comparação de biofilmes (VA vs. GE)

3.4.1. Resposta fototática de biofilmes de GE

A variação de F_0 ao longo do tempo sob diferentes níveis de irradiância em amostras de GE demonstrou um comportamento semelhante ao verificado em VA (Figura 3.12). Observou-se um aumento do valor de F_0 sob irradiâncias de 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

em consequência do aumento e acumulação de biomassa à superfície do sedimento. Nas amostras expostas a irradiâncias superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se uma resposta migratória descendente, indicada pelo decréscimo de F_0 . É visível na Figura 3.12 um decréscimo acentuado de F_0 sob irradiâncias muito altas ($>1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), indicando uma diminuição expressiva da concentração de células à superfície. A amostra transferida para o escuro apresentou uma redução progressiva da biomassa ao longo do tempo.

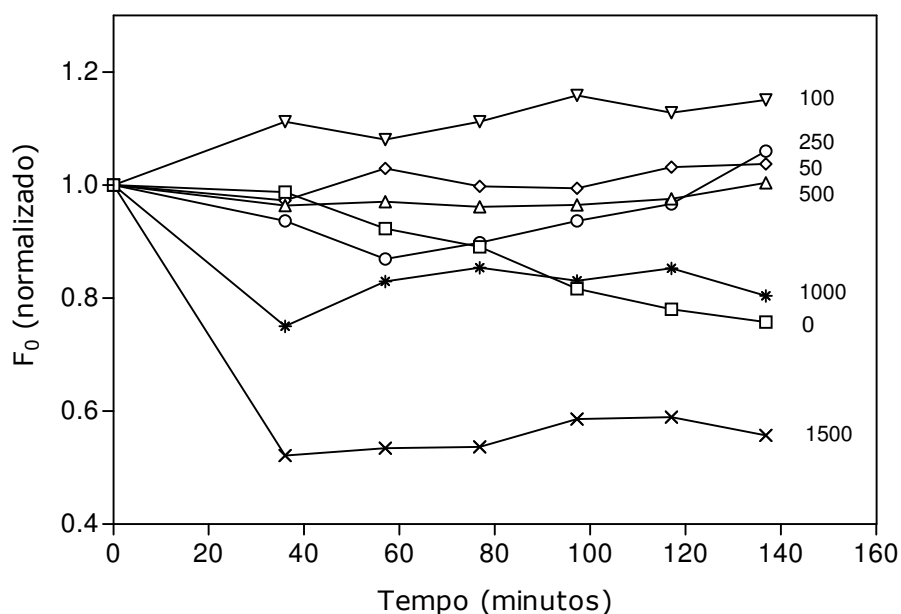


Figura 3.12. Resposta migratória fototática típica de MPB, com variação de F_0 , para diferentes níveis de irradiância, em amostras intactas de sedimento de GE. As amostras foram pré-expostas a uma irradiância constante de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os números representam a irradiância prévia a cada medição de F_0 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). F_0 foi normalizado aos valores iniciais, medidos imediatamente antes da separação das amostras pelos diferentes níveis de irradiância (tempo = 0).

3.4.2. Curvas de fotoacumulação de biofilmes de GE

A relação biomassa vs. irradiância em GE (Figura 3.13) vai de encontro ao descrito nos resultados obtidos em VA. As curvas apresentaram uma fase de incremento de F_0 correspondente a aumento de biomassa à superfície sob irradiâncias $50\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; um pico de biomassa, menos significativo que em VA, sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma fase final em que o aumento de irradiância à superfície do sedimento é coincidente (sob irradiâncias superiores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com um decréscimo de F_0 , equivalente à diminuição da concentração de MPB nas camadas superficiais do

sedimento. F_o diminuiu expressivamente para níveis de irradiância superiores a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

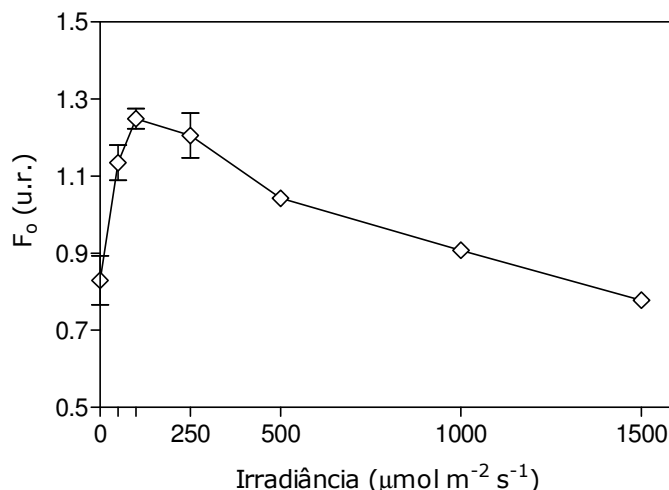


Figura 3.13. Curva típica de fotoacumulação de GE. Relação entre a biomassa superficial (F_o) e a irradiância incidente, construída com base na Figura 3.12. Exemplo de curva adquirida aproximadamente 90 minutos após a exposição a diferentes níveis de luz. As barras verticais representam 1 desvio-padrão.

3.4.3. Comparação de biofilmes (VA vs. GE)

As curvas de fotoacumulação de biofilmes provenientes de locais com diferentes granulometrias de sedimento revelaram diferenças significativas na resposta migratória fototática (Figura 3.14). Os biofilmes apresentaram um padrão comum de curva, contudo a amplitude de resposta migratória em relação às variações na irradiância incidente exibida pelo MPB com origem no sedimento mais fino (VA) foi muito superior, com F_o a variar mais de 120% entre o máximo e o mínimo, obtidos sob 100 e $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. O biofilme proveniente dos sedimentos de areia vasosa (mais grosseiros; GE) apresentou uma resposta migratória muito menos acentuada, com a variação entre máximo e mínimo a não exceder 40%. As diferenças entre as respostas migratórias entre cada biofilme são particularmente acentuadas sob irradiâncias elevadas.

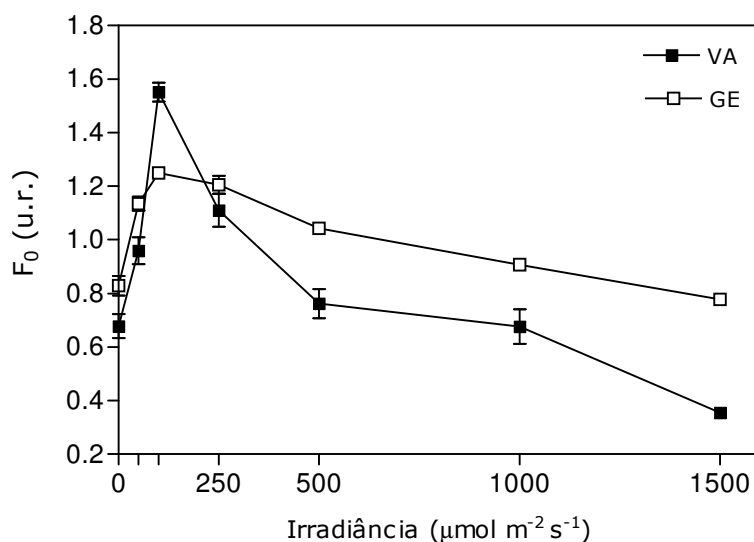


Figura 3.14. Comparação de curvas de fotoacumulação que relacionam a biomassa com o nível de irradiância em biofilmes provenientes de sedimentos com diferentes granulometrias (VA: vasa; GE: areia vasosa). Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 desvio-padrão.

A composição taxonômica relativa para cada local foi determinada para as amostras de três dos níveis de irradiância utilizados na construção das curvas de fotoacumulação. Os dois tipos de biofilmes apresentaram diferenças importantes no que respeita à concentração de células e à abundância relativa dos diferentes taxa de diatomáceas (Figura 3.15 A e B, Tabela 3.2 e 3.3). As amostras de VA, provenientes de sedimentos mais finos, foram dominadas pelas diatomáceas epipélicas *N. gregaria*, *N. phyllepta*, *P. crucicula* e *G. fasciola*. Em GE verificou-se dominância relativa das diatomáceas *Achnanthes deliculata* Kützinger, *Achnantes minutissima* Kützinger e *N. gregaria*. O número de espécies identificadas em VA foi significativamente superior ao identificado em GE (ver Tabelas 3.2 e 3.3). Em ambos os locais, a abundância relativa de cianobactérias (*Oscillatoria* sp. e *Merismopedia* sp.) e euglenófitas (*Euglena* sp.) foi <1%, como já havia sido demonstrado.

Tabela 3.3. Abundância relativa (%) de todos os taxa identificados em GE.

| Taxa | GE | | |
|---|------|------|------|
| | 100 | 500 | 1500 |
| <i>Achnanthes delicatula</i> Kützing | 31,7 | 31,4 | 29,1 |
| <i>Achnanthes minutissima</i> Kützing | 16,6 | 19,9 | 27,6 |
| <i>Amphora coffeaeformis</i> (Agardh) Kützing | 4,2 | 3,0 | 3,2 |
| <i>Amphora</i> sp. | 6,2 | 4,7 | 7,4 |
| <i>Cocconeis scutellum</i> Ehrenberg | 4,0 | | 2,2 |
| <i>Diploneis</i> sp. | | 3,7 | 2,2 |
| <i>Gomphonema</i> sp. | 4,2 | | |
| <i>Navicula gregaria</i> Donkin | 10,9 | 6,2 | 9,3 |
| <i>Navicula phyllepta</i> Kützing | 5,0 | 5,2 | 7,6 |
| <i>Nitzschia</i> sp. | 8,2 | 6,2 | 6,4 |
| Outras | 4,7 | 4,4 | 4,9 |

Apesar das diferenças relativas à composição taxonómica, ambos os biofilmes apresentaram uma diminuição de F_0 paralela à diminuição da concentração de células no milímetro superficial de sedimento. A concentração de células é inversamente proporcional ao nível de irradiância incidente, em ambas as comunidades (Figura 3.15 A e B).

A resposta migratória descendente sob irradiâncias elevadas foi acompanhada de alterações ao nível dos taxa presentes, sendo que esta variabilidade na abundância relativa de algumas espécies foi mais acentuada em VA. Nos biofilmes de VA, espécies como *N. gregaria* e *P. crucicula*, apresentaram um decréscimo expressivo de abundância relativa de 100 para 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e por oposição as diatomáceas *G. fasciola* e *N. frustulum* apresentaram um incremento proporcional ao aumento do nível de irradiância (Figura 3.15 C). *N. gregaria* e *P. crucicula* evidenciaram uma resposta migratória fototática activa, com fuga ao aumento de irradiância. Nas comunidades de GE observadas não se verificou uma variabilidade assinalável no que respeita à abundância relativa de cada espécie, com a variação da irradiância. A situação mais expressiva ocorre com o aumento de abundância relativa de *A. minutissima* de 100 para 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que pode demonstrar uma resposta fotofóbica menos pronunciada que os restante taxa.

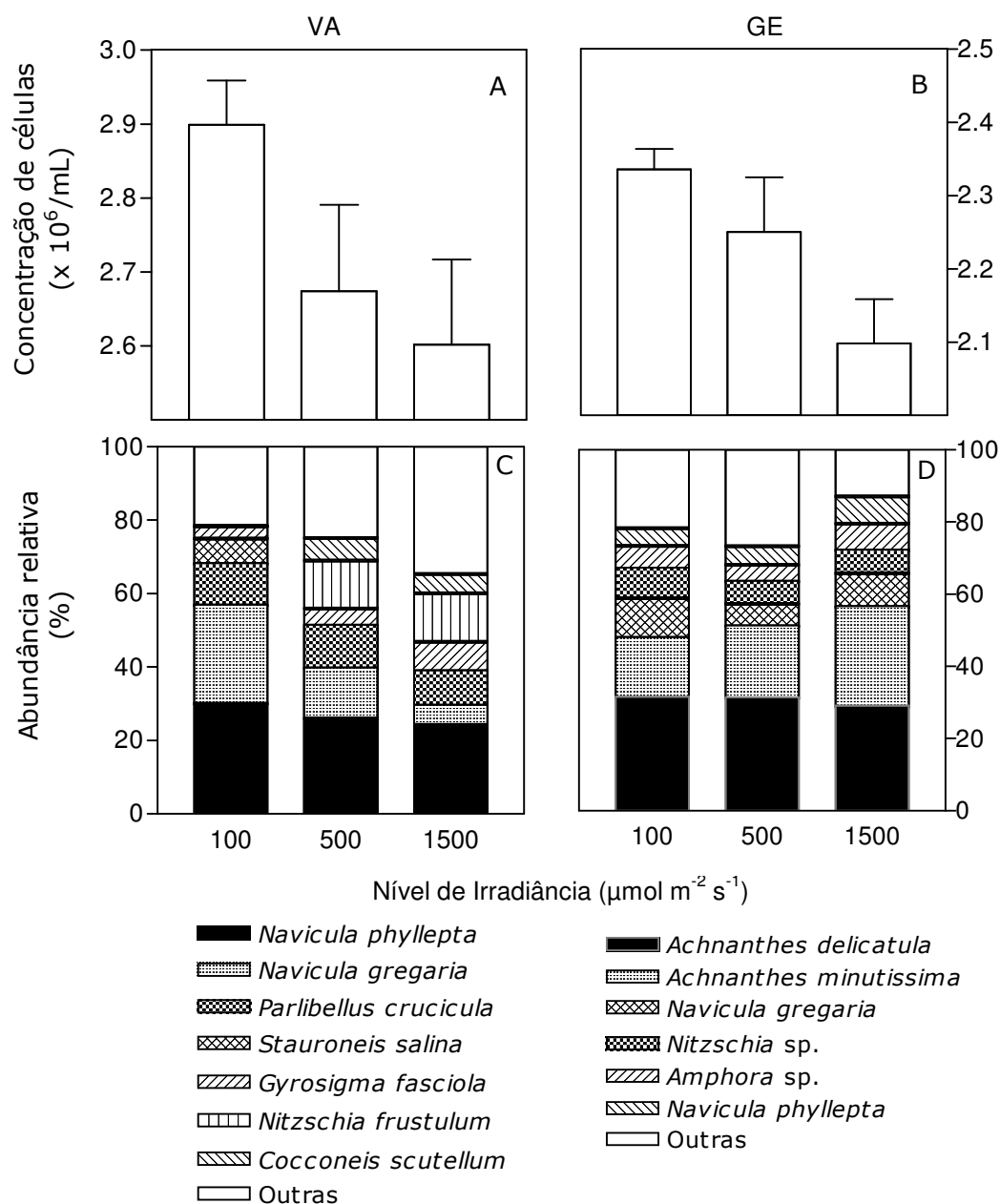


Figura 3.15. Concentração de microalgas (A e B) e abundância relativa dos diferentes taxa de diatomáceas (C e D) no primeiro milímetro de sedimento de amostras das duas estações de colheita (VA: vasa e GE: areia vasosa), após exposição a diferentes irradiancias. Amostras correspondentes à Figura 3.14. Valores médios de 3 medições. As barras verticais representam 1 erro-padrão. Apenas estão representados os taxa com abundância relativa > 5%.

4. DISCUSSÃO

4.1. Monitorização da biomassa microfitobêntica através de métodos ópticos (F_o , NDVI)

A migração vertical do MPB é um fenómeno frequentemente descrito e que resulta num enriquecimento de chl *a* à superfície do sedimento (e.g. Plamer e Round 1965; Pinckney *et al.* 1994; Serôdio *et al.* 1997; Consalvey *et al.* 2004b). Os ritmos migratórios exercem um efeito na resposta fotossintética ao nível da comunidade por causarem a variação da quantidade de células fotossintéticas expostas à luz (Serôdio *et al.* 2001). A caracterização dos padrões de variabilidade espacial e temporal na biomassa superficial é muito importante dada a relação directa com a produtividade primária (Serôdio e Catarino 2000, Consalvey *et al.* 2004b). Posto isto, vários autores têm recentemente usado métodos não-invasivos, para determinar e monitorizar a concentração de chl *a* sedimentar (Serôdio *et al.* 1997, Kromkamp *et al.* 1998, Paterson *et al.* 1998, Honeywill *et al.* 2002, Consalvey *et al.* 2004b). Os métodos utilizados permitem inferir sobre a distribuição e abundância dos organismos autotróficos bênticos (Paterson *et al.* 1998) sem interferir com a estrutura do sedimento. As vantagens operacionais demonstradas pela aplicação da fluorometria PAM em estudos do comportamento migratório do MPB tornaram a fluorescência num dos métodos mais frequentemente aplicado. A medição de F_o permite a monitorização das variações de biomassa na proximidade da superfície do sedimento. Serôdio *et al.* (2001) demonstrou que F_o é viável na avaliação da biomassa produtiva do MPB, definida como biomassa microalgal presente na zona fótica, e considerando a contribuição para a fotossíntese integrada em profundidade. Por outro lado, foram também encontradas boas correlações entre F_o e a biomassa fotossinteticamente activa, descrita simplesmente como a biomassa microalgal presente na zona fótica do sedimento (Guarini *et al.* 2000, Honeywill *et al.* 2002).

Considerando que a emissão de fluorescência por unidade de chl *a* depende do estado fisiológico das microalgas, F_o tem sido utilizado preferencialmente a outros parâmetros de fluorescência, uma vez que se demonstrou ser o menos afectado por factores ambientais (Serôdio *et al.* 1997, 2001). Contudo, a utilização de F_o como indicador de biomassa microfitobêntica apresenta alguns problemas. A medição de F_o requer um período de adaptação ao escuro como pressuposto essencial para a utilização da fluorescência como indicador da biomassa superficial. Todavia, o tempo de adaptação tem que ser mínimo de forma a prevenir uma resposta migratória que condicione os resultados da experiência (Consalvey *et al.* 2004b). Idealmente, no caso das diatomáceas, o período de adaptação ao escuro deve ser prolongado por vários minutos,

Ting e Owens (1993) sugerem mesmo um período de 45 minutos. Todavia, como demonstrado no presente estudo, a exposição ao escuro pode induzir um decréscimo da biomassa superficial. Procurando um compromisso entre minimizar os efeitos recentes do histórico luminoso da amostra e a resposta migratória artificial induzida pela adaptação ao escuro, F_o tem sido medido aplicando tempos curtos, tais como 2 (Serôdio *et al.* 2005), 5 (Serôdio *et al.* 2001) e 15 minutos (Honeywill *et al.* 2002). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as variações no F_o , medido após 2 minutos de adaptação ao escuro, são maioritariamente atribuídas a alterações na concentração da chl *a* superficial, demonstrando a independência da fluorescência mínima da chl *a* em relação ao nível de irradiância previamente incidente na amostra (histórico luminoso). A fluorometria do tipo PAM pode ser adicionalmente à monitorização das variações de biomassa, utilizada para obter informações sobre mecanismos fotofisiológicos que ocorram ao nível do biofilme (Kromkamp *et al.* 1998, Perkins *et al.* 2002).

Por outro lado, a aplicação de índices baseados na reflectância espectral tem sido cada vez mais utilizada como alternativa, na monitorização de variações da biomassa superficial. A utilização desta técnica permitiu observar amplas variações na reflectância à superfície do sedimento causadas pelo aumento de absorção dos pigmentos na sequência dos movimentos migratórios das diatomáceas, à semelhança do observado por outros autores (Kromkamp *et al.* 1998, Paterson *et al.* 1998). A formação de uma camada microfitobêntica superficial (biofilme) é registada no espectro de reflectância, por uma forte redução da reflectância aproximadamente a 675 nm, ocasionada pelo pico de absorção da chl *a* no vermelho. Morris (2005) analisou e caracterizou vários espectros emitidos a partir de superfícies “povoadas” por densos aglomerados de diferentes grupos (microalgas, macroalgas, plantas marinha). Um espectro emitido por uma superfície sedimentar dominada por diatomáceas é caracterizado por um patamar (pico amplo e extenso) entre 560 nm e 650 nm e uma pequena depressão a 630 nm. Todavia, a distinção entre os espectros emitidos por superfícies dominadas por determinadas macroalgas e superfícies dominadas por diatomáceas pode não ser muito clara (Morris 2005). A descrição do espectro típico das diatomáceas encaixa nos espectros obtidos no presente trabalho. A análise desses espectros permite concluir que um aumento na biomassa microfitobêntica à superfície causa um decréscimo expressivo na reflectância mais ou menos a 675 nm, essencialmente devido à absorção pela chl *a*.

Paterson *et al.* (1998) e Morris (2005) demonstraram que uma vantagem do uso dos espectros de reflectância passa pela possibilidade de estes serem utilizados na obtenção de informação quantitativa, através como já vimos, do cálculo de índices de

biomassa (NDVI, IR-B, BG, R-I), e de informação qualitativa, pela diferenciação de diferentes grupos de organismos baseado na composição pigmentar. Outra vantagem é a independência das medições de reflectância em relação ao nível de irradiância incidente sobre a superfície da amostra. A migração induz alterações nos espectros de reflectância que podem ser efectivamente seguidas utilizando o índice NDVI, uma vez que este é dificilmente sensível a variações fotofisiológicas como sugere Morris (2005). Este facto é demonstrado nos resultados obtidos e suportado por estudos prévios (Kromkamp *et al.* 1998, Morris 2005) e mostra que o uso de NDVI evita a maioria dos problemas associados à utilização da fluorescência. Morris (2005) demonstrou que entre os diferentes índices ópticos utilizados mais frequentemente para quantificar a biomassa microfitobêntica, o índice NDVI é o que apresenta uma correlação mais forte com a chl a sedimentar.

A discrepância observada entre as estimativas da biomassa produtiva baseadas em F_0 e em NDVI pode estar relacionada com o intervalo de profundidade abaixo da superfície do sedimento que é monitorizado em cada uma das duas metodologias. Neste estudo, a determinação do intervalo de profundidade correspondente aos sinais de reflectância não foi determinado. Contudo, uma vez que a reflectância foi medida sob irradiância constante é expectável que as zonas verticais monitorizadas por NDVI e F_0 sejam proporcionais. A reforçar esta hipótese estão os resultados obtidos que mostram respostas migratórias semelhantes, obtidas utilizando os dois métodos.

Apesar de, no presente estudo, se ter garantido uma distância fixa entre as fibras ópticas e a superfície do sedimento, assegurando que ambas monitorizavam áreas da superfície do sedimento equivalentes, Morris (2005) sugere que não é essencial a manutenção dessa distância no caso das medições de reflectância. O NDVI é calculado com base em dois valores que, independentemente da distância à superfície, variam proporcionalmente entre si. Todavia, em relação à fluorescência mantém-se o requisito de assegurar uma distância constante da fibra óptica do PAM à superfície do sedimento uma vez que o sinal de fluorescência medido decresce exponencialmente com o aumento da distância à superfície da amostra (fonte de emissão da fluorescência). Adicionalmente, Hakvoort *et al.* (1998) e Méléder *et al.* (2003) demonstraram as vantagens potenciais do uso da reflectância a partir de plataformas de detecção remota.

Em suma, as correlações significativas entre F_0 e NDVI e a chl a superficial do sedimento foram verificadas pelo presente estudo, sugerindo a utilização adequada de ambos os métodos na monitorização de variações na biomassa superficial. De forma geral, estes resultados vão de encontro aos obtidos por outros autores que tem utilizado

a reflectância espectral e a fluorescência para monitorizar alterações na biomassa fotossinteticamente activa (Serôdio *et al.* 1997, Kromkamp *et al.* 1998, Paterson *et al.* 1998, Honeywill *et al.* 2002, Consalvey *et al.* 2004b, Morris 2005). A solução mais eficaz para monitorizar variações na biomassa produtiva parece ser o uso complementar das duas metodologias. As medições de fotossíntese através da fluorometria do tipo PAM requerem um bom conhecimento das propriedades de absorção do biofilme, o que potencialmente, pode ser obtido utilizando a reflectância óptica (Morris 2005).

4.2. Resposta fototáctica e fotoprotecção comportamental

As células microfitobênticas estão adaptadas a um ambiente luminoso altamente variável. A exposição prolongada das células a irradiâncias elevadas pode provocar danos ao nível do aparelho fotossintético. O MPB desenvolveu estratégias comportamentais e fotofisiológicas para enfrentar com êxito esta variabilidade. Em particular, as diatomáceas demonstraram possuir uma resposta rápida na execução de movimentos migratórios verticais em direcção a zonas com disponibilidade luminosa mais favorável (Kromkamp *et al.* 1998, Underwood e Kromkamp 1999, Perkins *et al.* 2002, Cohn *et al.* 2004), ajustando a actividade fotossintética não só por regulação fisiológica, mas também através da exploração comportamental dos gradientes de luz.

À semelhança do uso das curvas fotossíntese vs. luz (P-I) utilizadas para caracterizar a resposta fisiológica a alterações na energia luminosa absorvida, a variação da resposta migratória em função da irradiância incidente pode ser adequadamente descrita pelas curvas de fotoacumulação (biomassa vs. irradiância). Os resultados dos ensaios efectuados, ilustrados pela resposta fototáctica sintetizada nas curvas de fotoacumulação, e assumindo F_0 como indicador de biomassa superficial, indicam que a concentração de chl *a* à superfície do sedimento varia com o nível de irradiância a que as amostras se encontram expostas. Para irradiâncias baixas, $50-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, há um incremento de biomassa, indicativa de resposta fototáctica positiva, equivalente a um movimento de migração ascendente. Para irradiâncias superiores, nomeadamente para níveis elevados ($500, 1000$ e $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verificou-se uma redução expressiva da biomassa, indicador de uma resposta fototáctica negativa. A evidência registada neste trabalho, de adaptação da resposta migratória à variabilidade luminosa a que estão sujeitas as comunidades de MPB, está de acordo, no geral, com o observado por outros autores para outras microalgas. Kingston (1999), Cohn *et al.* (1999, 2004) e Cohn (2001)

sugerem o uso da resposta migratória pelas comunidades microfitobênticas, como um mecanismo de fotoregulação selectivo, com fuga para zonas onde o nível de irradiância não seja prejudicial. De modo geral, tem sido referida a capacidade das comunidades de MPB para se acumularem em áreas de menor intensidade luminosa, com ciclos diurnos de movimentos verticais através do sedimento, evitando irradiâncias excessivas (Round e Palmer 1966, Cohn *et al.* 2004) e a activação dos mecanismos fisiológicos de fotoprotecção.

Resultados da resposta migratória em função do nível de irradiância incidente nos biofilmes microfitobênticos foram pela primeira vez descritos, sob a forma de curvas biomassa vs. irradiância, por Kingston (1999), sintetizando os resultados de experiências manipulativas da resposta fototáctica de *Euglena próxima* em condições *in situ*. O autor observou que densos agregados de euglenófitas eram especialmente visíveis nos dias enevoados. Esta tendência para a existência de grandes aglomerados de células à superfície dos sedimentos intertidais, sob níveis de irradiância mais baixos, foi verificada em experiências utilizando a chl *a* como indicador da biomassa superficial (Kingston 1999). O efeito de sombra, por redução do nível de luz incidente no sedimento superficial estuarino funciona como um impulso à migração vertical ascendente, durante a baixa-mar. Hopkins (1966) fez notar que o número de células da diatomácea *Navicula crucigera* é dez vezes maior nas superfícies sedimentares em áreas de sombra do que em áreas com intensidades luminosas elevadas. Kingston (1999) demonstrou ainda experimentalmente que a migração vertical ascendente de *Euglena proxima* tal como a de *Surirella gema* é inibida pela luz elevada e está relacionada com o efeito inibitório da luz alta na fotossíntese. Do mesmo modo, as diatomáceas *Cylindrotecha signata* e *Nitzschia tryblionella* apresentaram um decréscimo no número de células à superfície do sedimento, coincidente com o pico de intensidade luminosa, semelhante ao observado para *Euglena mutabilis* (Round e Palmer 1966, Kingston 1999).

Cohn *et al.* (1999) descreveu uma resposta fototáctica das diatomáceas com dois componentes que desencadeiam uma variação de direcção: uma resposta migratória no sentido da luz, em situações de luz baixa ou moderada e uma resposta em fuga da luz quando as amostras estão expostas a níveis de irradiância elevados, demonstrando que as diatomáceas apresentam uma resposta fotofóbica para níveis de luz potencialmente prejudiciais. A resposta fotofóbica impulsionada por irradiância elevada pode conferir várias vantagens às diatomáceas móveis. Pode evitar exposições prolongadas a níveis de irradiância elevados que podem degradar ou provocar danos no sistema fotossintético; por outro lado, podem servir para manter as células em níveis do sedimento onde a sua

presença as torne alvos menos fáceis para os predadores (Cohn *et al.* 2004). A regulação do comportamento migratório estimulada pelo nível de luz pode ser parcialmente responsável pela migração e estratificação das diatomáceas durante o desenvolvimento dos biofilmes (Cohn *et al.* 2004). Cohn *et al.* (1999 e 2004) e Cohn (2001) sugerem que as variações de direcção foto-induzidas são o mecanismo primário para a agregação de células em *spots* de luz; por outro lado, que a resposta fototáctica é sensível, requerendo apenas milissegundos de exposição a irradiâncias elevadas para que ocorram mudanças de direcção.

Embora a migração vertical descendente das microalgas sob luz elevada seja frequentemente descrita na bibliografia, apenas Kingston (1999) demonstrou evidências experimentais desse facto. A generalidade dos estudos mostram o efeito da sombra, e não monitorizam a variabilidade da biomassa em resposta a níveis de luz determinados, como ocorre com o presente trabalho. A monitorização da biomassa para irradiâncias concretas é muito importante para estabelecer uma resposta típica nos diferentes locais.

A resposta fototáctica aqui documentada sugere que a migração vertical das microalgas representa um mecanismo de fotoprotecção comportamental, para evitar níveis de luz fotoinibitórios, mantendo as células em condições óptimas para a fotossíntese. A resposta fototáctica negativa, sob irradiância alta, é assumida como uma resposta fotofóbica (Cohn *et al.* 2004).

A fotoinibição é um processo fisiológico complexo em que a inactivação das reacções do PSII se manifestam num decréscimo de rendimento sob intensidades luminosas saturantes (Ting e Owens 1993). Portanto, a “fuga” a intensidades luminosas prejudiciais, por migração vertical, funciona como um mecanismo alternativo ao processo de fotoregulação fisiológico. A migração vertical do MPB é neste contexto considerada como uma adaptação estratégica às oscilações luminosas do ambiente intertidal. A energia luminosa excessiva pode causar fotoinibição dinâmica, sendo que é reversível após um período de recuperação adequado no escuro em que a fluorescência mínima retorna ao nível inicial (Honeywill *et al.* 2002). Esta capacidade fotoprotectiva pode ser funcionalmente equivalente ao fenómeno extensamente descrito de “fuga” dos cloroplastos nas plantas superiores (Haupt e Scheuerlein 1990) e que efectivamente diminui os danos causados pela luz alta (Kasahara *et al.* 2002).

O pico de biomassa observado sob irradiâncias baixas, pode simplesmente reflectir o facto de que estes níveis de irradiância são demasiado baixos para não induzir respostas fotoprotectoras comportamentais ou fisiológicas. Sob condições luminosas favoráveis será expectável a acumulação de células microfitobênticas, explicando o facto

de que sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ambos os indicadores (F_o e NDVI) aumentem continuamente por um período de tempo superior ao verificado para outros níveis.

Na resposta fototáctica das amostras monitorizadas, os valores de F_o mais baixos (resposta fotofóbica) foram obtidos para as amostras expostas a irradiâncias mais elevadas e coincidem com a diminuição de F_v/F_m . A diminuição dos valores do rendimento quântico máximo do PSII é coincidente com a diminuição de biomassa superficial (F_o), *i.e.* a diminuição do rendimento quântico máximo do PSII coincide com o nível de irradiância e com o início da resposta fototáctica negativa. A razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) representa a eficiência de absorção da energia de excitação pelos centros de reacção abertos do PSII (Genty *et al.* 1989, Schreiber *et al.* 1995). Embora o rendimento quântico do PSII tenha sido determinado para as células que ficaram à superfície (não migraram) pode inferir-se o efeito negativo provocado pela exposição aos níveis elevados de irradiância. A queda nos valores de F_v/F_m indica um decréscimo na eficiência fotoquímica atribuída pela elevação nos valores de F_o e diminuição de F_m , o que infere uma diminuição da eficiência do aparelho fotossintético na absorção e transferência de energia luminosa até aos centros de reacção (Schreiber *et al.* 1995).

Os valores de F_v/F_m registados para irradiâncias baixas a moderadas (entre 0 e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) são de aproximadamente 0.7. Este é o valor máximo de F_v/F_m para as diatomáceas, e indica que as células se encontram num óptimo fisiológico (Rijstenbil 2003). As algas, especialmente as microalgas com chl *c*, apresentam um valor óptimo de F_v/F_m inferior ao valor de 0.8 usualmente registado para as plantas superiores (Kromkamp *et al.* 1998). Todavia, os valores de F_v/F_m podem variar significativamente entre espécies de diatomáceas. Esta variabilidade foi observada recentemente no trabalho de Forster e Martín-Jézéquel (2005), onde são referidos valores médios, por exemplo, de 0.83 para *Achnantes longipes* e 0.71 para *Amphora hybrida*.

4.2.1 Aplicação das curvas de fotoacumulação a diferentes biofilmes

O padrão de variação da biomassa produtiva foi semelhante para ambos os locais de amostragem (VA e GE). Todavia, apesar do comportamento geral similar, a amplitude de resposta foi muito menor em GE. Este facto pode estar relacionado com o tipo de sedimento e a existência de uma comunidade mais móvel em VA. A comunidade encontrada em VA é tipicamente uma comunidade epipélica com a dominância do género

Navicula, e em particular a existência de espécies de maiores dimensões e com uma mobilidade significativa. Destaca-se a ocorrência das espécies *Navicula gregaria* e *Navicula phyllepta* típicas de comunidades epipélicas de zonas intertidais (Underwood e Provot 2000). Em GE, a comunidade de diatomáceas é dominada por espécies de menor dimensão, sendo *Achnanthes delicatula* o taxa mais abundante. Observa-se a dominância de espécies normalmente associadas a comunidades em que a mobilidade é reduzida (epipsâmicas). A predominância de comunidades diferentes em cada local está directamente relacionada com o tipo de sedimento predominante e subjacente às condições hidrodinâmicas de cada local. A dominância de formas de vida aderentes aos grãos de sedimento e a ausência de uma comunidade claramente epipélica em GE, reflecte o dinamismo físico subjacente a um substrato mais arenoso (Vilbaste *et al.* 2000). Segundo De Jonge (1985) as comunidades epipsâmicas ocorrem geralmente em ambientes intertidais com correntes pronunciadas e sedimentos menos coesivos, o que ocorre em GE.

As diferenças entre os biofilme estudados, desde a granulometria do sedimento à composição taxonómica, podem estar na base da menor amplitude de resposta verificada em GE e que reflecte uma biomassa com capacidade migratória menos expressiva. VA apresenta uma variação de biomassa muito mais acentuada, subjacente à forte mobilidade evidenciada pela comunidade predominante no local. A maioria das espécies encontradas para cada local foi descrita por outros autores para o mesmo local, nomeadamente nos estudos desenvolvidos por Serôdio *et al.* (2003).

4.3. Implicações na modelação da produtividade primária

As comunidades microfitobênticas estão sujeitas a uma variabilidade temporal significativa, ao longo de várias escalas de tempo: horária (variação horária de diferentes estímulos ambientais: luz, temperatura, salinidade), semi-lunar (ciclo de águas vivas/águas mortas) e sazonal (variação sazonal de parâmetros ambientais, da composição taxonómica e do estado fisiológico das comunidades). A ocorrência de ritmos migratórios afecta substancialmente a resposta fotossintética das comunidades microfitobênticas. Por outro lado, a variabilidade temporal da produtividade primária pode dever-se não apenas a variações no rendimento quântico da fotossíntese, ocasionadas por uma resposta fotofisiológica das microalgas, mas também a variações na eficiência de absorção da luz (Serôdio *et al.* 2001). O estudo de Serôdio *et al.* (2001) no estuário do

Tejo demonstrou que as variações de biomassa produtiva associadas aos ritmos migratórios constituem a causa principal da acentuada variabilidade horária e semi-lunar da resposta fotossintética destas comunidades. Este facto tem implicações relevantes na definição de planos de amostragem para comunidades dominadas por microalgas móveis, evidenciando a necessidade de caracterizar adequadamente a variabilidade das taxas fotossintéticas à escala horária, evitando erros de extrapolação de taxas horárias para escalas de tempo maiores. Esta variabilidade, condicionada entre outros factores, pela mutabilidade das condições de luz, produz efeitos expressivos na produtividade primária total dos ecossistemas estuarinos, pelo que nas abordagens recentes à modelação das taxas de produtividade primária anual destes ecossistemas, tem sido atribuído papel relevante à variabilidade temporal dependente dos ritmos migratórios (Pinckney e Zingmark 1993, Serôdio e Catarino 2000). Estas estimativas foram baseadas em modelos matemáticos descritivos da variabilidade horária das taxas fotossintéticas da comunidade, que demonstram a ocorrência de ritmos migratórios como causa provável para a elevada variabilidade da produtividade primária do MPB nas escalas de tempo horária e semi-lunar (Serôdio *et al.* 2001).

O estudo dos efeitos de vários parâmetros físicos na resposta migratória pode auxiliar o melhoramento de modelos matemáticos desenvolvidos para estimar taxas de produção primária, considerando a variabilidade da biomassa produtiva de origem microfitobêntica, em função dos estímulos ambientais. A execução de um mecanismo de fotoprotecção comportamental, permite ao MPB controlar a resposta fotossintética não apenas por alterações ao nível do rendimento quântico da fotossíntese mas pela regulação complementar e activa da fracção de luz disponível que é absorvida para fotossíntese. O presente estudo mostrou que há uma exploração activa da variabilidade ambiental relativamente à luz. Os movimentos verticais no interior do sedimento, ao longo do gradiente de luz, constituem uma forma de resposta rápida e flexível de otimizar a fotossíntese, permitindo uma alternativa aos mecanismos fisiológicos, nomeadamente a modificações ao nível do aparelho fotossintético em resposta às alterações na energia luminosa incidente (Kromkamp *et al.* 1998, Serôdio *et al.* 2001). Contudo, apesar das curvas de fotoacumulação relacionarem quantitativamente a biomassa superficial com a irradiância incidente, não podem ser directamente usadas para prever a variação da biomassa superficial a partir da medição da irradiância, durante os períodos de emersão. Isto porque estas curvas foram construídas a partir de biofilmes totalmente formados à superfície do sedimento (induzido pela exposição a luz baixa), e como tal, a relação biomassa vs. irradiância estabelecida pode não representar a acumulação padrão de

células ao longo da variação horária da intensidade luminosa solar. Por outro lado, as medições efectuadas resumem curtos períodos de tempo, sem incidir na variabilidade de outros factores, que *in situ*, afectam directamente a fotossíntese (pH, O₂, CO₂).

O forçamento ambiental dos ritmos migratórios é não só uma adaptação estratégica para prevenir danos, mas também para maximizar recursos. A maximização da disponibilidade de luz pelo MPB está directamente relacionada com a optimização de níveis de produção. Apesar do efeito imediato dos ritmos migratórios se fazer sentir ao nível da variabilidade horária da produtividade primária nas zonas intertidais, o seu efeito global na produtividade primária dos ecossistemas estuarinos, assume um significado mais importante, atendendo à significativa contribuição do MPB para os reconhecidos níveis elevados de produtividade associados a estas zonas costeiras (Serôdio 2002).

Modelos recentes têm referido a importância dos ritmos migratórios na quantificação das taxas instantâneas de fotossíntese integradas em profundidade, modelando-as em função da biomassa produtiva explícita (Guarini *et al.* 2000, Serôdio e Catarino 2000) ou implicitamente (Pinckney e Zingmark 1993). A influência da variabilidade horária na biomassa produtiva é modelada em função dos ciclos solares e de maré, resultando na previsão de valores máximos de biomassa coincidentes com o meio do dia, sob irradiância máxima (Pinckney e Zingmark 1991, Guarini *et al.* 2000, Serôdio e Catarino 2000). A consistente e forte resposta fotofóbica sob irradiância elevada verificada neste estudo indica que os pressupostos considerados para o padrão horário da biomassa produtiva devem ser revistos e que provavelmente representam uma simplificação excessiva da situação real.

5. CONCLUSÕES

A utilização de métodos ópticos, não invasivos, para caracterizar e monitorizar os padrões de variabilidade de comunidades microfitobênticas é muito importante em zonas intertidais. Contudo, a aplicação destes métodos em ambientes intertidais envolve um conjunto de pressupostos e algumas dificuldades técnicas. Tal está, em parte, relacionado com a ecologia e dinâmica das comunidades microfitobênticas e do ambiente particular criado pela acção de maré nas zonas estuarinas.

O uso de fluorescência do tipo PAM e de reflectância espectral mostrou-se apropriado para monitorizar e caracterizar, em amostras naturais de MPB, a variabilidade no conteúdo superficial de chl *a*, em consequência de movimentos migratórios rítmicos direccionados pela variabilidade da energia luminosa disponível.

A capacidade das comunidades de diatomáceas para experimentar migrações verticais sensíveis à luz, tem sido desde há muito referida (Cohn 2001). O presente trabalho sintetizou a informação da resposta fototáctica em curvas de fotoacumulação, demonstrando o padrão típico de variação da biomassa (como conteúdo em chl *a* superficial) em função do nível de irradiância incidente. Verificou-se, claramente, que variações na irradiância incidente podem ter um efeito primordial na expressão do comportamento migratório vertical. Os resultados revelaram uma resposta migratória bifásica, incluindo uma resposta positiva sob luz baixa (fototaxia positiva com migração ascendente), e uma resposta negativa (fotofóbica com migração descendente), com diminuição expressiva da biomassa, sob irradiâncias elevadas.

Em geral, concluiu-se que a resposta migratória em função da mutabilidade das condições luminosas pode funcionar como um mecanismo de fotoregulação e fotoprotecção comportamental, em alternativa aos mecanismos fisiológicos. Tal permite evitar danos no aparelho fotossintético e otimizar a fotossíntese. Respostas migratórias fotoinduzidas são assim fortemente vantajosas para o MPB uma vez que podem favorecer a maximização do aproveitamento da luz e consequentemente das taxas fotossintéticas.

A migração, enquanto movimentações verticais nos biofilmes que colonizam os sedimentos intertidais é uma característica importante da ecologia do MPB estuarino. Sendo as variações de biomassa produtiva associadas aos ritmos migratórios, a principal causa da evidente variabilidade horária da resposta fotossintética das comunidades de MPB, este trabalho tem implicações na caracterização adequada da variabilidade das taxas de fotossíntese à escala horária. Do mesmo modo, pode servir para o melhoramento dos modelos matemáticos de estimação das taxas de produção primária globais dos ecossistemas costeiros intertidais. Demonstrou-se que, para além do controlo

endógeno dos ritmos migratórios, há uma capacidade de resposta migratória em função de estímulos exteriores, que funcionam como um forçamento ambiental. O padrão de resposta fototáctica foi observado em ambos os biofilmes, diferenciados pela granulometria do sedimento e pela composição taxonômica. Todavia, foram encontradas diferenças expressivas entre os dois tipos de sedimento, com os biofilmes de sedimentos mais arenosos a exibirem uma menor amplitude de resposta fototáctica. Esta evidência poderá estar relacionada com a existência de comunidades de diatomáceas com comportamentos migratórios diferentes: comunidades epipélicas vs. epipsâmicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Admiraal W (1984) The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. In: Round FE, Chapman DJ (editores) *Progress in Phycological Research* 3:269-322.

Barranguet C, Kromkamp JC (2000) Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 204:39-52

Bartoli M, Nizzoli D, Viaroli P (2003) Microphytobenthos activity and fluxes at the sediment-water interface: interactions and spatial variability. *Aquatic Ecology* 37:341-349

Blanchard GF, Guarini JM, Richard P, Gros P, Mornet F (1996) Quantifying the short-term temperature effect on light-saturated photosynthesis of intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 134:309-313

Blanchard GF, Paterson DM, Stal LJ, Richard P, Galois R, Huet V, Kelly J, Honeywill C, de Brouwer J, Dyer K, Christie M, Seguignes M (2000) The effect of geomorphological structures on potential biostabilisation by microphytobenthos on intertidal mudflats. *Continental Shelf Research* 20:1243-1256

Bourrelly P (1981) *Les Algues d'eau douce. Tome II: Les Algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées.* Edições Boubée. Paris. 438pp

Brotas V, Cabrita T, Portugal A, Seródio J, Catarino F (1995) Spatiotemporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus estuary (Portugal). *Hydrobiologia* 301:93-104

Brotas V, Plante-Cuny MR (1998) Spatial and temporal patterns of microphytobenthic taxa of estuarine tidal flats in the Tagus estuary using pigment analysis by HPLC. *Marine Ecology Progress Series* 171: 43-57

Cohn SA (2001) Photo-stimulated effects on diatom motility. In: Häder DP e Lebert ML (editores) *Photomovement.* Elsevier. Amsterdão. 375-402pp

Cohn SA, Bahena M, Davis JT, Ragland RL, Rauschenberg CD, Smith BJ (2004) Characterisation of the diatom photophobic response to high irradiance. *Diatom Research* 19:167-179

Cohn SA, Spurck TP, Pickett-Heaps JD (1999) High energy irradiation at the leading tip of moving diatoms causes a rapid change of cell direction. *Diatom Research* 14:193-206

Comissão Europeia – Direcção Geral do Ambiente (2001) A União Europeia e as Zonas Costeiras. Luxemburgo. Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias 29pp

Consalvey M, Jesus B, Perkins RG, Brotas V, Underwood GJC, Paterson DM (2004a) Monitoring migration and measuring biomass in benthic biofilms: the effects of dark/far-red adaptation and vertical migration on fluorescence measurements. *Photosynthetic Research* 81:91-101

Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC (2004b) The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom Research* 19:181-202

Consalvey M, Perkins RG, Paterson DM, Underwood GJC (2005) PAM Fluorescence: a beginners guide for benthic diatomists. *Diatom Research* 20:1-22

CREMA L'Houmeau - Benthic Productivity and Food Webs Team (2005) <http://www.ifremer.fr/crema/equipe1/mpbgb.html>

Cunha M A, Dias J M, Almeida M A, Lopes J F and Alcântara F (2003) Fluxes of bacterioplankton between a tidal estuary and the sea: returning to the "Outwelling Hypothesis". *Aquatic Ecology* 37:45-54

De Brouwer JFC, de Deckere E, Stal LJ (2003) Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56:313-324

De Jonge VN (1985) The occurrence of 'epipsammic' diatom populations: a result of interaction between physical sorting of sediment and certain properties of diatom species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 21: 607-622

De Jonge VN, de Jong DJ (2002) 'Global change' impact of inter-annual variation in water discharge as a driving factor to dredging and spoil disposal in the River Rhine system and of turbidity in the Wadden Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55:969-991

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (1999) Hydrological characterisation of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer. *Oceanologica Acta* Vol.22 N°5

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (2000) Tidal propagation in Ria de Aveiro Lagoon, Portugal. *Physics, Chemistry and Earth (B)* Vol.25 N° 4:369-374

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (2003) A numerical system to study the transport properties in the Ria de Aveiro lagoon. *Ocean Dynamics* 53:220-231

Dyer KR, Christie MC, Wright EW (2000) The classification of intertidal mudflats. *Continental Shelf Research* 20:1039-1060

Eaton JW, Moss B (1966) The estimation of numbers and pigment content in epipelagic algal populations. *Limnology and Oceanography* 11:584-595

Fauvel P, Bohn G (1907) Le rythme des marées chez les diatomées littorales. *Compte Rendu des Seances de la Société Biologie* 62:121-123

Forster RM, Martin-Jézéquel V (2005) Photophysiological variability of microphytobenthic diatoms after growth in different types of culture conditions. *Phycologia* 44:393-402

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87-92

Guarini JM, Blanchard GF, Bacher C, Gros P, Riera P, Richard P, Goulet D, Galois R, Prou J, Sauriau PG (1998) Dynamics of spatial patterns of microphytobenthic biomass: inferences from a geostatistical analysis of two comprehensive surveys in Marennes-Oleron Bay (France). *Marine Ecology Progress Series* 166:131-141

Guarini JM, Blanchard GF, Gros P, Goulet D, Bacher C, (2000) Dynamic model of the short-term variability of microphytobenthic biomass on temperate intertidal mudflats. *Marine Ecology Progress Series* 195: 291-303

Guarini JM, Gros P, Blanchard GF, Bacher C (1999) Short-term dynamics of intertidal microphytobenthic biomass. Mathematical modelling. *Cr Acad Sci III-Vie* 322:363-373

Hartley B, Barber HG, Carter JR (1996) An atlas of British Diatoms. Editado por Sims, PA

Haupt W, Scheuerlein R (1990) Chloroplast movement. *Plant, Cell and Environment* 13:595-614

Hakvoort JHM, Heineke M, Heymann K, Kuhl H, Riethmüller R, Witte G (1998) A basis for mapping the erodibility of tidal flats by optical remote sensing. *Marine and Freshwater Research* 49:867-873

Honeywill C, Paterson DN, Hagerthey SE (2002) Determination of microphytobenthic biomass using pulse-amplitude modulated minimum fluorescence. *European Journal of Phycology* 37:485-492

Hopkins JT (1966) The role of water in the behaviour of an estuarine mudflat diatom. *Journal of the Marine Biology Association U.K.* 46:617-626

Janssen M, Hust M, Rhiel E, Krumbein WE (1999) Vertical migration behaviour of diatom assemblages of Wadden Sea sediments (Dangast, Germany): a study using cryo-scanning electron microscopy. *Internatl Microbiol* 2:103-110

Jesus B, Mendes CR, Brotas V, Paterson DM (2005) Effect of sediment type on microphytobenthos vertical distribution: Modelling the productive biomass and improving ground truth measurements. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. *In press*.

Kasahara M, Kagawa T, Iokawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420:829-832

Kingston MB (1999) Effect of light on vertical migration and photosynthesis of *Euglena* próxima (*Euglenophyta*). *Journal of Phycology* 35:245–253

Krammer K & Lange-Bertalot H (1988) Bacillariophyceae. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H & Mollenhauer D (editores). Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ed. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart

Krammer K. & Lange-Bertalot H (1986) Bacillariophyceae. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H & Mollenhauer D (editores) Naviculaceae, Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ed. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart

Kromkamp J, Barranguet C, Peene J (1998) Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Marine Ecology Progress Series* 162:45-55

Lorenz CJ (1967) Determination of Chlorophyll a and pheopigments Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12:343-346

MacIntyre HL, Geider RJ, Miller DC (1996) Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats .1. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19:186-201

Méléder V, Barille L, Launeau P, Carrère V, Rince Y (2003) Spectrometric constraint in analysis of benthic diatom biomass using monospecific cultures. *Remote Sensing of Environment* 88:386-400

Middelburg JJ, Barranguet C, Boscher HTS, Herman PMJ, Moens T, Heip CHR (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: An in situ ^{13}C -labeling study. *Limnology and Oceanography* 45:1224-1234

Miller DC, Geider RJ, MacIntyre HL (1996) Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. II. Role in Sediment Stability and Shallow-water Food Webs. *Estuaries* 19:202-212

Morris (2005) Quantifying primary production of microphytobenthos: application of optical methods. PhD. Rijksuniversiteit Groningen

Palmer JD (1976) Clock-controlled vertical migratory rhythms in intertidal organisms. In: Coursey PJ (editor) *Biological Rhythms in Marine Environments*. University of South Carolina Press. Colombia 239-255pp

Palmer J D, Round FE (1967) Persistent vertical-migration rhythms in benthic microflora. (IV). The tidal and diurnal nature of the rhythm in the diatom *Hantzschia virgata*. *Biological Bulletin of the Marine Biology Laboratories, Woods Hole, Massachusetts* 132:44-55

Palmer JD, Round FE (1965) Persistent, vertical-migration rhythms in benthic microflora. I. The effect of light and temperature on the rhythmic behaviour of *Euglena obtusa*. *Journal of the Marine Biology Association U.K.* 45:567-582

Paterson DM (1989) Short-term changes in the erodibility of intertidal cohesive sediments related to the migratory behaviour of epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography* 34:223-234

Paterson DM, Crawford RM, Little C (1986) The structure of benthic diatom assemblages: a preliminary account of the use and evaluation of low-temperature scanning electron microscopy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 96: 131-141

Paterson DM, Hagerthey SE (2001) Microphytobenthos in contrasting coastal ecosystems: biology and dynamics. In: Reise, K. (Ed.) (2001) *Ecological comparisons of sedimentary shores*. *Ecological Studies: analysis and synthesis* 151:105-125

Paterson DM, Wiltshire KH, Blackburn MJ, Davidson IR (1998) Microbiological mediation of spectral reflectance from intertidal cohesive sediments. *Limnology and Oceanography* 43:1207-1221

Peragallo H e Peragallo M (1997-1908) Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins. Micrographie-Editeur. Grez-sur-Loing 491pp.

Perkins RG, Oxborough K, Hanlon ARM, Underwood GJC, Baker NR (2002) Can chlorophyll fluorescence be used to estimate the rate of photosynthetic electron transport within microphytobenthic biofilms? Marine Ecology Progress Series 228:47-56

Perkins RG, Underwood GJC, Brotas V, Snow GC, Jesus B, Ribeiro L (2001) Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emersion period. Marine Ecology Progress Series 223:101-112

Pinckney J, Piceno Y, Lovell CR (1994) Short-term changes in the vertical distribution of benthic microalgal biomass in intertidal muddy sediments. Diatom research 9:143-153

Pinckney J, Zingmark R (1993) Modeling the annual production of the intertidal benthic microalgae in estuarine ecosystems. Journal of Phycology 29:396-407

Pinckney J, Zingmark RG (1991) Effects of tidal stage and sun angles on intertidal benthic microalgal productivity. Marine Ecology Progress Series 76:81-89

Plante-Cuny MR (1974) Evaluation par spectrophotométrie des teneurs en chlorophyll-a fonctionnelle et en phaeopigments des substrats meubles marins, O.R.S.T.O.M., Nosy-Bé

Rijstenbil JW (2003) Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. Marine Ecology Progress Series 254:37-48

Round FE (1971) Benthic marine diatoms. Oceanography and Marine Biology Annual Review 9:83-139

Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990) The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press. Cambridge 744pp

Round FE, Palmer JD (1966) Persistent, vertical-migration rhythms in benthic microflora: II. Field and laboratory studies of diatoms from the banks of the River Avon. Journal of Marine Biology Associated of UK 46:191-214

Rouse JW, Haas RH, Schell JA, Deering DW (1973) Monitoring vegetation systems in the great plains with ERTS, Third ERTS Symposium, NASA SP-351, vol. 1, NASA, Washington DC 309-317pp

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulating fluorometer. *Photosynthesis Research* 10:51-62

Schreiber, U., Hormann, H., Neubauer, C. & Klughammer, C. (1995) Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:209–20

Serôdio J (2002) Ritmos migratórios do microfitobentos e produtividade primária estuarina. In: *Fragmentos em Ecologia*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Escolar Editora 223-238

Serôdio J (2003) A chlorophyll fluorescence index to estimate short-term rates of photosynthesis by intertidal microphytobenthos. *Journal of Phycology* 39:33-46

Serôdio J (2004) Analysis of variable chlorophyll fluorescence in microphytobenthos assemblages: implications of the use of depth-integrated measurements. *Aquatic Microbial Ecology* 36:137-152

Serôdio J, Catarino F (1999) Fortnightly light and temperature variability in estuarine intertidal sediments and implications for microphytobenthos primary productivity. *Aquatic Ecology* 33:235–241

Serôdio J, Catarino F (2000) Modelling the primary productivity of intertidal microphytobenthos: time scales of variability and effects of migratory rhythms. *Marine Ecology Progress Series* 192:13-30

Serôdio J, Da Silva JM, Catarino F (1997) Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll a fluorescence. *Journal of Phycology* 33:542-553

Serôdio J, da Silva JM, Catarino F (2001) Use of in vivo chlorophyll a fluorescence to quantify short-term variations in the productive biomass of intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 218:45-61

Serôdio J, Silva JM, Brotas V, Elias E, Vieira S, Barroso F (2003) Uma nova metodologia para a quantificação da produtividade primária do microfitobentos estuarino. *Relatório de Progresso do Projecto PDCTM/1999/MAR/15318*. Universidade de Aveiro

Serôdio J, Vieira S, Cruz S, Barroso F (2005) Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence. *Marine Biology* 146:903-914

Sokal RR and Rohlf FJ (1981) *Biometry*, 2nd edition. W. H. Freeman and Company, United States of America 499-530pp

Stal LJ, de Brouwer FC (2003) Biofilm formation by benthic diatoms and their influence on the stabilization of intertidal mudflats. *Berichte – Forschungszentrum TERRAMARE* nº 12

Thornton DCO, Dong LF, Underwood GJC, Nedwell DB (2002) Factors affecting microphytobenthic biomass, species composition and production in the Colne Estuary (UK). *Aquatic Microbial Ecology* 27:285–300

Ting CS, Owens TG (1993) Photochemical and Nonphotochemical Fluorescence Quenching Processes in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* 101: 1323-1330

Tyler AC, McGlathery KJ, Anderson IC (2003) Benthic algae control sediment-water column fluxes of organic and inorganic nitrogen compounds in a temperate lagoon. *Limnology and Oceanography* 48:2125-2137

Underwood GJC, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In: *Advances in Ecological Research* 29:93-153

Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ (1995) The measurement of microbial carbohydrate expolymers from intertidal sediments. *Limnology and Oceanography* 40:1243-1253

Underwood GJC, Provot L (2000) Determining the environmental preferences of four epipelagic diatom taxa: growth across a range of salinities, nitrate and ammonium conditions. *European Journal of Phycology* 35:173–182

Vilbaste S, Sundback K, Nilsson C, Truu J (2000) Distribution of benthic diatoms in the littoral zone of the Gulf of Riga in the Baltic Sea. *European Journal of Phycology* 35:373-385.

Witkowski A, Lange-Bertalot H e Metzeltin D (2000) Diatom flora of marine coasts I. In: Lange-Bertalot H (editor). *Iconographia Diatomologica* Vol. 7. Edição Ganter Verlag. Ruggell 925pp

Yallop ML, de Winder B, Paterson DM, Stal LJ (1994) Comparative structure, primary production and biogenic stabilisation of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 39:565-582